

NAIARA OLIVEIRA FIGUEIREDO

**ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA PROMOVE O CRESCIMENTO DE MILHO E
A QUALIDADE DO SOLO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agroecologia, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

F475a
2019

Figueiredo, Naiara Oliveira, 1994-

Atividade microbiológica promove o crescimento de milho
e a qualidade do solo / Naiara Oliveira Figueiredo. – Viçosa,
MG, 2019.

xii, 49 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Raphael Bragança Alves Fernandes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 41-49.

1. Humus. 2. Fósforo. 3. Micro-organismos do solo.
4. Solos - Manejo. 5. Solos - Qualidade. 6. Milho.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Solos.
Programa de Pós-Graduação em Agroecologia. II. Título.

CDD 22. ed. 631.417

NAIARA OLIVEIRA FIGUEIREDO

**ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA PROMOVE O CRESCIMENTO DE MILHO E
A QUALIDADE DO SOLO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 31 de Maio de 2019.

Márcio Rocha Francelino

Paulo Prates Júnior

Irene Maria Cardoso
(Coorientadora)

Raphael Bragança Alves Fernandes
(Orientador)

Dedico este trabalho aos meus pais, agricultores, que me mostraram o valor do trabalho e o amor pelo campo e pela Agroecologia.

Para Deus nada é impossível. Mateus 19:26

AGRADECIMENTOS

A Deus e o universo por permitir tanto. Por Ele e para Ele são todas as coisas.

Aos meus pais, Maria de Lourdes e Juarez, minha base, exemplo de luta para superar todas as dificuldades impostas nessa caminhada. Ao meu irmão Romário e minha sobrinha Hannah, e meus tios e primos que tanto me auxiliaram nessa caminhada.

Ao meu orientador Raphael, pela paciência e disponibilidade para realização deste trabalho. Pelo apoio e palavras confortantes nos momentos que mais precisei.

Aos meus coorientadores Anderson e Irene, por todas as contribuições ao longo do trabalho.

Ao Departamentos de Solos, Fitotecnia e Nutrição, pela estrutura física e suporte na realização desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Agroecologia, a secretária Rosangela e a Comissão Coordenadora, por trabalharem em prol da pesquisa em Agroecologia na Universidade.

A Sílvia Priori, pelo apoio e pelas conversas durante essa caminhada.

Ao Programa Milho e ao Laboratório de Sementes, pela colaboração e apoio.

Ao Cláudio e Evandro, do Laboratório de Física do solo; Carlos Fonseca e Marquinhos, do Laboratório de Fertilidade do Solo; Poliana, do Laboratório de Análise de Plantas; e ao Júlio, do Almoxarifado, minha gratidão pela disponibilidade e dedicação em contribuir com essa pesquisa.

Ao Laboratório de Associações Micorrízicas do Departamento de Microbiologia, por dar suporte a este trabalho. Gratidão imensa à Camila, professora Catarina e todos amigos que fiz durante esse tempo.

Ao Paulo Prates, pela dedicação e apoio na finalização deste trabalho e pela amizade construída nesse processo.

Ao Rodrigo e Flávia, que desde minha passagem por Rio Pomba têm me possibilitado inúmeras oportunidades de aprendizado e crescimento.

Ao agricultor Edmar de Araponga, por nos receber na sua propriedade com carinho e disposição.

Aos meus amigos de república, Monalisa, Jéssica e Valber, pela paciência, conversas e apoio durante essa jornada da pós-graduação e por tornaram os dias mais leves e divertidos.

Aos meus amigos construídos ao longo dessa caminhada, que mesmo longe, sempre estão presentes, apoiando em todas as lutas e vibrando em todas as conquistas.

À Universidade Federal de Viçosa, por oferecer ensino de qualidade e contribuir para educação com qualidade no país.

À FAPEMIG, pela imensa contribuição na pesquisa do estado e por conceder a oportunidade de permanência na Pós-graduação através da disponibilização de bolsas.

À gestão Lula-Dilma, que, através de várias políticas me permitiu ocupar este espaço.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite e por toda contribuição para este trabalho.

À todas e todos que contribuíram para a realização deste trabalho, minha eterna gratidão!

BIOGRAFIA

NAIARA OLIVEIRA FIGUEIREDO, filha de Maria de Lourdes Oliveira Tomaz e Juarez Tomaz de Figueiredo, nasceu no dia 29 de outubro de 1994 em Tarumirim-MG. Filha de agricultores familiares, tive minha trajetória marcada pelos desafios da vida no campo. Passou por experiências que me permitiram perceber a roça como espaço de construção de conhecimentos que vai além do dinheiro recebido ao final da semana. Aprendi sobre a importância do solo para sobrevivência, mas também, conheci as cruéis manifestações da desigualdade social brasileira.

Entrando para as estatísticas, contei apenas com a presença materna na maior parte da minha infância e adolescência. No contato com a escola, onde estavam também os “filhos de patrão” de meus pais, me questionava por que algumas pessoas iam para escola de uma forma que eu considerava “muito bem vestida, usando até moletom e mochila”, enquanto eu carregava meu material no saquinho de farinha. Educada em grande parte pela minha mãe, aprendi na base do trabalho, sobre a importância da independência feminina. Durante a época de colheita do café, eu ia para roça com minha mãe, escondendo dos amigos e amigas da mesma idade os trajes de “boia fria”. Era difícil entender porque apesar de todos e todas serem filhos de agricultoras, as realidades lhes eram tão diferentes. Meu pai para tentar dar uma vida melhor para nossa família foi morar na “América” e nos deu sua ausência por 5 anos. Graças a isso, conseguimos “nosso pedaço de terra” para trabalhar e o nosso barraco foi substituído por uma casa grande com quartos e banheiros.

A partir de 2003, muitos aspectos da nossa vida no campo foram transformados, ainda muito criança para perceber os motivos e consequências daquilo, foi através do programa social *Luz para todos*, criado no Governo Lula (2003 – 2011) para levar energia elétrica à população rural, que passamos a assistir TV em casa, enquanto muitos brasileiros e brasileiras da mesma idade nunca cogitaram um cotidiano sem luz elétrica. Passei a ser beneficiada pelo *Bolsa Família*, programa denominado por alguns brasileiros de “bolsa pra sustentar vagabundo”, no entanto, foi essa renda que auxiliou no sustento da nossa família e permitiu que meus pais colocassem na mesa alimentos pouco consumidos, como maçã, iogurte e biscoito água e sal.

A vida no campo ganhou outros contornos a partir de 2003. E em meio a essas transformações, já no final do ensino médio conheci o *Projeto Transformar* da EMATER/MG, onde compreendi o dia a dia na roça com outro olhar. Através dele tive o primeiro contato com a Universidade Federal de Viçosa, através da *Troca de Saberes e da Semana da Juventude Rural*. No ano seguinte, ingressei na graduação, direito alcançado pela ampliação das Universidades Públicas, iniciada em 2007 por meio do *Reuni*, e a política pública de *Cotas* para ingresso de alunos de escolas públicas. Encontrou na graduação em Agroecologia, realizado através de um Instituto Federal, a possibilidade de modificar a realidade de sua família sem negar a importância da vida no campo.

Fruto de muita resistência, dedicação e oportunidades geradas por diversas políticas públicas e programas sociais que são criticados por pessoas que jamais tiveram seus privilégios sociais questionados, a conclusão dessa dissertação permite exibir a importância em trabalharmos para eliminar as desigualdades sociais e garantir o acesso às oportunidades.

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO	1
3. MATERIAL E MÉTODOS	6
3.1 Locais de coleta de amostras	6
3.2 Procedimentos de coleta.....	7
3.3 Microrganismos Eficientes (EM).....	9
3.4 Experimento e arranjo experimental	10
3.5 Instalação dos experimentos	11
3.6 Condução dos experimentos	12
3.7 Variáveis analisadas	13
3.8 Análises Estatísticas	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1 Caracterização química do solo	20
4.2 Caracterização física do solo	21
4.3 Caracterização microbiológica do solo.....	24
4.4 Análise de plantas.....	33
5. CONCLUSÕES	40
6. REFERÊNCIAS.....	41

RESUMO

FIGUEIREDO, Naiara Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2019. **Atividade microbiológica promove o crescimento de milho e a qualidade do solo.** Orientador: Raphael Bragança Alves Fernandes. Coorientadores: Anderson Almeida Pacheco e Irene Maria Cardoso.

A boa qualidade do solo é uma característica desejável, pois garante que ele cumpra suas funções básicas, dentre as quais se destaca a produção de alimentos. Nos solos tropicais, uma limitação à qualidade do solo é o presumido baixo teor de P, em função dos altos níveis de adsorção deste nutriente. A partir da generalização que os solos brasileiros são pobres em P, altas doses de fertilizantes inorgânicos têm sido aplicadas para buscar suprir as necessidades das plantas. Porém, um manejo de solo que vise aumentar o teor de matéria orgânica e favorecer a atividade microbiológica pode aumentar a disponibilidade de P para as plantas a partir de formas menos lábeis, sem a necessidade de tantos insumos externos e com impactos positivos no desenvolvimento e produção vegetal. Amostras de solo de uma propriedade agroecológica foram utilizadas, e de um de horizonte B representando um solo degradado. No primeiro experimento avaliou-se o efeito da eliminação da microbiota nativa via autoclavagem sobre a qualidade do solo, absorção de P e desenvolvimento e produção de plantas de milho. No segundo experimento avaliou-se o efeito da adição de matéria orgânica e de matéria orgânica combinada com microrganismos eficientes (EM) sobre as mesmas variáveis no horizonte B. Todos os materiais foram incubados por 30 d e, seguidamente, plantas de milho foram cultivadas por 50 d em casa de vegetação. Durante o cultivo foi avaliada a altura das plantas. Após o cultivo, amostras de solo foram coletadas para análises físicas, químicas e microbiológicas, e as plantas mensuradas e colhidas para a determinação da biomassa e dos teores de nutrientes acumulados. Os tratamentos nos dois experimentos pouco afetaram a qualidade física e química dos solos. Ainda que a autoclavagem estivesse presente em ambos os experimentos, o procedimento adotado na avaliação da comunidade microbiológica não foi capaz de diagnosticar, no geral, expressivas diferenças dos tratamentos, em termos da presença, diversidade, dominância e riqueza de diferentes grupos de bactérias, fungos e fungos micorrízicos arbusculares analisadas. A manutenção da comunidade nativa de microrganismos garantiu

maior altura, acúmulo de P e produção de biomassa das plantas de milho. O cultivo vegetal também indicou que a simples adição de matéria orgânica em solos de baixa fertilidade ou degradados não garantiu incrementos comparáveis ao seu uso combinado com a adição de EM nas mesmas variáveis altura, acúmulo de P e produção de biomassa. Os resultados confirmam a importância da preservação da microbiota nativa do solo e do potencial do uso de coquetéis de microrganismos em solos degradados para incrementar a produtividade vegetal. Também revelam que apenas a adição de matéria orgânica não garante maior produtividade das plantas em solos de baixa fertilidade ou degradados, ou sem condições adequadas para a atividade microbológica, ou ainda com restrições impostas pelo uso de biocidas (agrotóxicos).

ABSTRACT

FIGUEIREDO, Naiara Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2019. **Microbiological activity promotes corn growth and soil quality.** Advisor: Raphael Bragança Alves Fernandes. Co-Advisors: Anderson Almeida Pacheco and Irene Maria Cardoso.

Soil quality is a desirable feature because allows soil carry out its basic functions, including food production. In tropical soils, a limitation to the soil quality is the presumed low P contents due to the high adsorption of this nutrient. Since the generalization that Brazilian soils are poor in P, high doses of inorganic fertilizers have been applied to meet the plants requirement. However, soil management practices aiming increase the organic matter content and promote microbiological activity can increase P availability to plants from less labile P forms. In these cases, there is not necessary to provide so many external inputs, with additional positive impacts on development and crop production. Soil samples were collected from an agroecological farm and from a B horizon representing a degraded soil. In a first experiment we evaluated the effect of the elimination of native microbiota via autoclaving on soil quality, P uptake and development and production of corn plants. In the second experiment, we evaluated the effect of the addition of organic matter and organic matter combined with efficient microorganisms (EM) on soil quality of the B horizon. All soil materials were incubated for 30 d and after corn plants were cultivated for 50 d in greenhouse. During cultivation, plant height was evaluated. After cultivation, soil samples were collected for physical, chemical, and microbiological analysis, and the plants measured and collected to determine biomass and nutrient contents. The treatments in both experiments little affected the physical and chemical quality of the soil. Although autoclaving was present in both experiments, the procedure adopted to evaluate the microbiological community did not able to identify, in general, relevant differences among treatments, in terms of the presence, diversity, dominance and richness of different groups of bacteria, fungi and arbuscular mycorrhizal fungi analyzed. The conservation of the native community of microorganisms guaranteed higher height, P accumulation, and biomass production of corn plants. Plant cultivation also indicated that the simple addition of organic matter in low fertility or degraded soils did not guarantee comparable increments to its use combined with the addition of EM in the same variables

height, P accumulation, and biomass production. The results confirm the importance of preserving the native soil microbiota and the potential of using microorganism cocktails in degraded soils to increase plant productivity. They also reveal that only the addition of organic matter does not guarantee higher plant productivity in low fertility or degraded soils, or in soils without suitable conditions for microbiological activity, or also with restrictions imposed by the use of biocides (pesticides).

1. INTRODUÇÃO

A partir da década de 1960, ocorreu um intenso processo de modernização da agricultura brasileira (CARA, 2009) que causou grandes impactos ambientais, provocados, especialmente, pela adoção da monocultura tecnificada em larga escala. A destruição das florestas e da biodiversidade, a erosão dos solos e a contaminação dos recursos naturais, em especial, dos recursos hídricos são alguns dos problemas ainda observados (FEIDEN, 2005).

Os agroecossistemas modernos e tecnificados são caracterizados por apresentarem alto grau de artificialização em relação às condições ambientais, sendo altamente dependente de insumos produzidos industrialmente e adquiridos no mercado (FEIDEN, 2005; PETERSEN et al., 2009). As técnicas envolvidas neste sistema de produção procuram adaptar as condições locais às necessidades das explorações, por meio de práticas como uso de insumos químicos (corretivos, fertilizantes inorgânicos e pesticidas), irrigação, drenagem, sementes melhoradas e etc. O uso dessas práticas pode acarretar problemas como a degradação do solo, devido, entre outras coisas, a redução da matéria orgânica, a compactação dos solos, a redução da infiltração da água no perfil e, em consequência, a intensificação da erosão (FEIDEN, 2005).

O uso de fertilizantes inorgânicos com adubações, em quantidade normalmente superiores àquelas exigida pelas plantas, em especial, se deve ao interesse em respostas rápidas de produção em modelos convencionais e intensivos de produção (KLEIN & AGNE, 2012). No Brasil, nas últimas décadas com efeito desse modelo tem aumentado o consumo de fertilizantes. No período de 2009 a 2016, verificou-se no país um crescimento do consumo de nutrientes (kg/ha) como N (42%), P_2O_5 (23%) e K_2O (51%), bem maior do que o aumento (17%) no rendimento agrovegetal (kg/ha) (CUNHA et al., 2018). Desses nutrientes, o fósforo em especial merece atenção

O fósforo é essencial no metabolismo das plantas, desempenhando papel importante na transferência de energia na célula, na respiração e na fotossíntese. O suprimento adequado de P é essencial desde os estádios iniciais de crescimento da planta e determina o desenvolvimento do sistema radicular e a parte aérea (GRANT et al., 2001). O teor médio de fósforo nos solos encontra-se entre 0,2 e 5,0 g kg⁻¹, mas apenas uma pequena fração está em formas

disponíveis para as plantas (ARAÚJO & MACHADO, 2006). A adsorção do fósforo é especialmente importante em solos tropicais, onde o fenômeno é pronunciado.

O fósforo adicionado ao solo é rapidamente adsorvido pelas argilas, apresentando baixa concentração na solução, com consequente redução de sua disponibilidade para as plantas. Este processo o torna pouco móvel nos solos tropicais, ou seja, poucas são suas perdas por lixiviação. Disto resulta a constatação de que o fósforo, em geral, tende a permanecer nos solos. No caso de adubações, o elemento ainda permanece concentrado no local onde é aplicado, a não ser que seja absorvido pelas plantas, translocado pela ação dos organismos do solo ou removido pela erosão (KLEIN & AGNE, 2012).

Os solos comportam-se como fonte quando fornece quantidades de P que a planta necessita, ou dreno quando compete com as plantas fixando a maior parte do P. Os solos intemperizados, como é o caso dos solos brasileiros, tendem a comporta-se como dreno e competir com as plantas pela fixação do P adicionado via adubação (NOVAIS & SMITH 1999). Isto leva a recomendação de altas quantidades de fósforo a serem aplicadas para atender a demanda adequada do nutriente as plantas cultivadas (SOUSA et al., 2004).

O fósforo para a fabricação de fertilizantes é proveniente da exploração de recursos minerais não renováveis, efetuada mediante mineração e posterior processamento de rochas fosfáticas (PANTANO et al., 2016). Algumas estimativas dão conta que essas fontes devem ser exauridas nos próximos 50 a 100 anos (CORDELL et al., 2009). Além de ser escasso, a fabricação de adubos fosfatados demanda muita energia, e a matéria prima para sua fabricação, em sua maior parte é oriunda de importação, o que encarece o fertilizante, já que a matéria prima é determinada por mercados internacionais.

Neste cenário, torna-se relevantes a avaliação de alternativas para o melhor uso do fósforo, que inclui a tentativa de aproveitamento das formas adsorvidas em solos. Para o melhor aproveitamento do P já adsorvido é preciso utilizar manejos que potencializem a atividade biológica, pois muitos organismos possuem a capacidade de aumentar a disponibilidade de P no sistema. Para isto, é necessário compreender a dinâmica do fósforo e suas interações com a microbiota do solo. Para beneficiar a vida no solo é preciso de promover práticas de manejo que aumentem os teores de matéria orgânica, aumente a ciclagem

de nutrientes, proteja o solo contra a erosão, etc. Isto exige repensar as formas como a agricultura é praticada nos trópicos.

Formas de agricultura que levem em consideração as questões ambientais e sociais devem ser privilegiadas. Para isto é preciso delinear sistemas de produção mais próximos aos ecossistemas naturais (FEIDEN, 2005). Com esse propósito, esforços precisam ser despendido para substituir o uso de fertilizantes químicos nos agroecossistemas, optando-se por implementar mudanças no manejo que possibilitem a adequada nutrição e proteção das plantas por meio de fontes orgânicas (SMITH & SMITH, 2011) o que inclui melhorar a ciclagem de nutrientes. Para tanto, faz-se necessário adoção de manejos que propiciem a fertilidade do solo como resultante de processos biológicos, o que se dá por meio do desenho de agroecossistemas diversificados, como proposto pela agroecologia (ALTIERI, 2012).

O manejo agroecológico torna os sistemas de produção menos dependentes de insumos externos e com isto amplia a autonomia e a independência dos agricultores, auxiliam na conservação da biodiversidade do solo e da água (SANTOS et al., 2014). Dentre as tecnologias utilizadas no manejo agroecológico do solo, encontra-se os sistemas agroflorestais. Os sistemas agroflorestais contribuem para aumentar a autonomia e a segurança alimentar do agricultor, aumentar a biodiversidade nos agroecossistemas e melhorar a qualidade do solo (CARDOSO et al., 2001, SOUZA et al., 2010).

Os sistemas agroflorestais caracterizam-se por consorciar árvores e culturas agrícolas. O sistema radicular das árvores explora grandes volumes de solo, absorvendo água e nutrientes, que são redistribuídos sobre o solo com a queda das folhas (ALTIERI, 2012; PIROLI & PIROLI, 2018). Este processo favorece o aumento da biodiversidade aporte de matéria orgânica, a ciclagem de nutrientes, a umidade do solo e, colaborando para a melhoria dos atributos químicos, físicos e biológicos do solo (JOSE, 2009).

Outra tecnologia utilizada no manejo agroecológico é a inoculação com organismos eficientes (EM). Esse inoculante é produzido a partir de microrganismos obtidos em áreas de mata, utilizando-se como substrato arroz cozido, colocado no solo e coberto com serapilheira (BONFIM et al., 2011). Os microrganismos que compõem a solução de EM têm potencial para decompor a

matéria orgânica e disponibilizar nutrientes, tais como P e N, colaborando para a manutenção da qualidade do solo.

O manejo agroecológico favorece as sinergias entre plantas e organismos, que favorecem a absorção de nutrientes no solo, dentre os quais destaca- a simbiose entre raízes e fungos micorrízicos. (PRATES JUNIOR et al., 2019). Estes fungos adquirem os nutrientes do solo os transferem para as raízes colonizadas em troca de açúcares que as plantas disponibilizam aos fungos (SMITH & READ, 2008). Dentre os nutrientes adquiridos neste tipo de associação, destacam-se aqueles pouco móveis no solo, tais como P (CARDOSO et al., 2010). Vários estudos têm comprovado a maior eficiência de hifas de fungos micorrízicos na aquisição e transporte de P do solo até as raízes em comparação com o próprio sistema radicular vegetal, especialmente em condições de baixa disponibilidade do nutriente (SOUZA et al., 2011)

Os FMA são componentes importantes da comunidade microbiana e contribuem para a manutenção da diversidade vegetal para a absorção de nutrientes pelas plantas, e, portanto, para a ciclagem de nutrientes. Ainda, contribuem para a, estabilidade do solo e absorção de água (SMITH & READ, 2008). A interação desses fungos com a matéria orgânica do solo tem demonstrado um efeito sinérgico no sentido de promover maiores incrementos na biomassa seca das plantas (MENDES FILHO et al., 2010).

Muitos estudos indicam a importância dos microrganismos e seus benefícios para a fertilidade dos solos, entretanto, poucos trabalhos relacionam o manejo agroecológico com a nutrição de fósforo para as plantas.

2. OBJETIVO

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da microbiota de solos manejados sob diferentes condições para a melhoria da qualidade do solo.

2.1 Objetivos específicos

Como objetivos específicos tem-se:

- Avaliar efeito da microbiota de solos sob manejo agroecológico no desenvolvimento de plantas de milho.

- Avaliar o efeito da atividade biológica após adição de serapilheira e EM em solos de baixa fertilidade natural no desenvolvimento de plantas de milho.
- Avaliar a capacidade de manejos sustentáveis em disponibilizar P para as plantas.
- Avaliar se condições de manejo mais sustentáveis melhoram a qualidade física e química de solos de baixa fertilidade natural.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Locais de coleta de amostras

No presente estudo, foram utilizadas amostras provenientes de duas situações distintas: um solo proveniente de área sob manejo agroecológico e um horizonte B latossólico (Bw).

O primeiro foi coletado em uma propriedade agroecológica localizada em Araponga, e o segundo, em no município de Viçosa, ambas na Zona da Mata de Minas Gerais. A região é de clima tropical, com temperatura média de 18 °C e precipitação média anual de 1.500 mm (CARDOSO et al., 2001). O relevo é predominantemente montanhoso em Araponga e ondulado em Viçosa (IBGE, 2010).

Em Araponga, a grande maioria dos agricultores são familiares, e o solo é pouco revolvido, pois há pouco uso de máquinas. A partir de trabalhos desenvolvidos em parceria entre as organizações dos agricultores o Centro de Tecnologia Alternativas da Zona da Mata (CTA-ZM) e a Universidade Federal de Viçosa (UFV), sistemas agroflorestais (SAF), em especial com café, foram implantados no início da década de 90 (DUARTE et al., 2008). Como os SAFs melhorou-se a qualidade do solo, diversificou-se a produção e reduziu os gastos e a bienalidade do café (SOUZA et al., 2010).

A propriedade agroecológica do presente estudo possui diferentes áreas de cultivo de café em sistema agroflorestal e um fragmento de Mata. O cafezal utilizado na amostragem (Figura 1) ocupa aproximadamente 4 ha da propriedade, com plantas de 18 anos, cultivadas em espaçamento 3,0 x 1,5 m. Esse cafezal foi anteriormente adubado com cama de aviário, mas desde 2017 não recebeu mais esse procedimento, tendo em vista restrições verificadas para a exportação do produto, segundo normas para a certificação como orgânico (BRASIL, 2011). Na adubação da área é utilizado atualmente farinha de osso, material vegetal picado de bananeira da própria propriedade e fosfato natural reativo e serapilheira de floresta secundária. Esporadicamente é aplicado calcário.

No SAF com cafeeiros predominam as espécies arbóreas guatambu (*Aspidosperma polyneurum* Muell. Arg.) e capoeira branca (*Solanum argentum* Dunal), ambas em densidade de 40 indivíduos/ha, e bananeira (*Musa sp.*), com 160 indivíduos/ha (VIEIRA JÚNIOR, 2016). À exceção da bananeira, que é

utilizada nas bordas da lavoura com a função de quebra vento, as espécies de árvores são distribuídas aleatoriamente no interior da lavoura.

A amostra do horizonte B latossólico foi coletada no município de Viçosa em local sem nenhum tipo de cultivo, porém com expressiva colonização por plantas espontâneas pioneiras, com predomínio de gramíneas. A utilização desta amostra é justificada como contraste com a amostra do solo agroecológico, por apresentar baixa fertilidade natural e baixo teor de matéria orgânica.



Figura 1: Área de coleta de amostras de solo no cafezal agroecológico utilizado no presente estudo, em Araponga-MG.

3.2 Procedimentos de coleta

3.2.1 Solo orgânico e horizonte B latossólico

Amostras simples do solo agroecológico foram coletadas, em março de 2018, na profundidade de 0 a 20 cm e em vários pontos da lavoura para se formar uma amostra composta representativa. O material foi acondicionado em sacos plásticos não fechados buscando preservar a atividade microbiológica, foram mantidos abertos em câmara úmida do Departamento de Engenharia Civil da Universidade Federal de Viçosa (UFV), até o momento da montagem do experimento. O solo foi utilizado no experimento sem passar por secagem ou peneiramento. Subamostras foram secas e passadas em peneira de 2 mm para

a obtenção da Terra Fina seca ao ar (TFSA), que foi caracterizada quanto à granulometria e apresentou 34% de argila, 14 % de silte, 41 % de areia grossa e 11 % de areia fina, sendo considerado como da classe Franco-Argilo-Arenoso.

Amostras do horizonte B foram coletadas no mês de abril do mesmo ano na região conhecida como Tiro de Guerra, local frequentemente utilizado para coletas de solos para estudos do Departamento de Solos da UFV. O material, foi acondicionando em sacos plásticos para o transporte. Após a secagem ao ar, o material também foi passado em peneiras de 2 mm (TFSA) e armazenadas em sacos plásticos para análises e uso posterior no experimento. A análise granulométrica do material indicou 77% de argila, 14 % de areia grossa e 9 % de areia fina, o que implicou na classe Muito Argilosa.

Amostras de TFSA do solo agroecológico e do horizonte B utilizados no experimento foram submetidos à análise química de rotina e os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Caracterização química de rotina do solo sob manejo agroecológico (SAGROEC) e horizonte B (H_B) utilizados no experimento antes da montagem do experimento em casa de vegetação

	pH	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	CTC _{EF}	CTC _T	MO	P-rem
	(H ₂ O)	mg/dm ³		-----		cmol _c /dm ³		-----		dag/kg	mg/L
SAGROEC	5,39	14,1	274	5,70	1,14	0	8,8	7,54	16,34	10,46	12,0
H _B	4,73	0,4	0	0,13	0,03	0,1	2,6	0,26	2,76	0,76	4,9

3.2.2 Serapilheira

A serapilheira utilizada no estudo foi coleta em fragmento de floresta secundária existente na propriedade agroecológica de Araponga (Figura 2), com área de 2,5 ha, Trata-se de um remanescente de Mata Atlântica, sem marcas recentes de perturbação antrópica, salvo algumas atividades de remoção de galhos, ramos e serapilheira para a adubação do café natural, um dos manejos utilizados pelo agricultor em outro talhão na propriedade (VIEIRA JÚNIOR, 2016).



Figura 2: Coleta de serapilheira no fragmento de mata nativa da propriedade agroecológica em Araponga-MG.

A coleta da serapilheira foi executada da forma como o agricultor normalmente faz, sendo efetuada no interior da área de mata, evitando-se as bordas. Posteriormente, o material foi seco, triturado em moinho e armazenado em sacos plásticos para posterior uso no experimento.

3.3 Microrganismos Eficientes (EM)

Os microrganismos eficientes (EM) utilizados foram adquiridos no Sindicato dos Trabalhadores e Trabalhadoras da Agricultura Familiar de Espera Feliz-MG (SINTRAF-MG/CUT). O preparo do EM foi realizado por um dos agricultores do sindicato e seguiu as recomendações de Bonfim et al. (2011), sendo utilizados 300 g de arroz selecionado na mata após a colonização do substrato e 300 mL de garapa, obtido de cana-de-açúcar, sendo rico em sacarose, utilizado como fonte de nutrientes para os microrganismos na composição do produto final de 2 L de suspensão. O uso e armazenamento da suspensão de EM também seguiu as indicações de Bonfim et al (2011).

A caracterização química da suspensão de EM foi efetuada no material antes e depois da autoclavagem após digestão nitroperclórica. Os resultados (Tabela 2) indicam ausência de P em ambas as amostras e perda de nutrientes

com a autoclavagem, que foi associada às perdas por volatilização durante este processo (Tabela 2).

Tabela 2: Caracterização da suspensão de microrganismos eficientes antes (EM) e depois da autoclavagem (EM_{AUT})

Nutriente	EM	EM _{AUT}
----- mg/L ----		
P	<ld	<ld
K	65,7	12,1
Ca	13,8	<ld
Mg	19,5	3,9
S	25,5	0,6
Cu	1,3	0,7
Fe	6,1	<ld
Zn	0,8	0,3
Mn	0,3	<ld
B	0,8	<ld

<ld = menor que limite de detecção

3.4 Experimento e arranjo experimental

Dois experimentos foram conduzidos utilizando-se o delineamento em blocos casualizados.

No primeiro experimento avaliaram-se os seguintes tratamentos:

- T1 - solo proveniente de SAF orgânico (S_{or})
- T2 – solo proveniente de SAF orgânico autoclavado (S_{orA})

Os tratamentos do segundo experimento foram:

- T3 - horizonte B autoclavado + serapilheira + EM (B_{se})
- T4 - horizonte B autoclavado + serapilheira + EM autoclavado na mistura final (B_{seA})
- T5 - horizonte B autoclavado (B_A)

O primeiro experimento visou avaliar o efeito da microbiota nativa de solos agroecológicos (S_{or}) e, o segundo, objetivou avaliar a adição de matéria orgânica e de microrganismos eficientes (EM) em solo degradado (S_{orA} , B_{se} e B_{seA}), representado pelo horizonte B latossólico de baixa fertilidade natural. Em ambos os experimentos, conduzidos com cinco repetições, foram avaliados a qualidade do solo, e a absorção de P e o desenvolvimento de plantas de milho cultivadas em casa de vegetação.

As sementes de milho utilizadas no experimento foram da variedade Sol da Manhã, cedidas pelo Programa Milho, do Departamento de Fitotecnia da UFV. A escolha desta variedade justifica-se por ser uma variedade tradicionalmente utilizada por agricultores familiares. A variedade foi desenvolvida pelas unidades Agrobiologia e Milho e Sorgo da EMBRAPA juntamente com a comunidade Sol da Manhã de agricultores localizada em Seropédica-RJ. Trata-se de uma variedade precoce, adaptada a solos de baixa fertilidade natural, eficiente no uso de N e com alto potencial produtivo (EMBRAPA, 1996; BORGES et al., 2011)

Um ensaio prévio de germinação foi conduzido para averiguar a viabilidade das sementes, que indicou 72 % de poder germinativo, indicando a boa qualidade do lote utilizado.

3.5 Instalação dos experimentos

Os dois experimentos foram conduzidos simultaneamente em casa de vegetação do Departamento de Solos da UFV. Nesta região o clima é do tipo “Cwa”, segundo a classificação de Köppen (1948).

Na instalação dos experimentos foram utilizados vasos de polietileno de 3 dm³, que foram preenchidos com massa calculada das misturas representativas dos tratamentos com base na densidade do solo calculada pelo método da proveta (EMBRAPA, 2017). No solo agroecológico foi realizado a determinação da umidade atual (EMBRAPA, 2017) para o preenchimento dos vasos, uma vez que o material não foi seco para manter a atividade microbiológica.

Os procedimentos de autoclavagem foram sempre realizados em duas etapas, no Departamento de Microbiologia da UFV, utilizando-se temperatura aproximada de 120-125°C durante 1 h, com intervalo de 24 h entre as operações.

O tratamento (B_{seA}) foi autoclavado, antes e depois da adição da serapilheira e EM, totalizando, portanto, 4 procedimentos de autoclavagem.

O tratamento (S_{orA}), juntamente com os vasos do tratamento (B_{seA}) (B_{seA}) foram levados novamente para autoclave pelo mesmo período citado acima.

A dose de serapilheira utilizada nos tratamentos (B_{se}) e (B_{seA}) foi única no início do experimento e de $0,5 \text{ dm}^3$ de material picado. Uma aplicação inicial de EM nos mesmos tratamentos B_{se} e B_{seA} foi efetuada a partir de uma diluição 1:3 (v:v) da suspensão estoque, com cada unidade experimental recebendo 100 mL formados por 33 mL da suspensão estoque original e 67 mL de água destilada.

Nos dois experimentos não foi efetuada qualquer tipo de adubação, uma vez que objetivo era avaliar o papel dos microrganismos na utilização de P em solos agroecológicos e de baixa fertilidade natural.

A calagem foi efetuada apenas nos tratamentos do segundo experimento que contavam com horizonte B (B_{se} , B_{seA} e B_A), uma vez que análises químicas indicaram necessidade da prática. Na correção da acidez, foi utilizado CaCO_3 P.A. na quantidade de 6g por vaso (3 kg).

Uma vez finalizada a instalação dos experimentos, todas as unidades experimentais foram mantidas em casa de vegetação por um período de 30 d. Durante esse tempo, a umidade dos vasos foi mantida com irrigações frequentes.

Após o período de incubação, sete sementes de milho da variedade Sol da Manhã foram plantadas em cada vaso de ambos os experimentos, mantendo-se três plântulas por vaso após desbaste realizado 10 dias após a emergência.

3.6 Condução dos experimentos

Os experimentos foram mantidos com irrigação frequente e de acordo com necessidade das plantas.

No segundo experimento, os tratamentos B_{se} e B_{seA} receberam aplicações semanais de solução de EM diluída 1:9 (v:v), a partir da aplicação de 100 mL de mistura contendo 11 mL da suspensão estoque e o restante de água deionizada. Para o tratamento B_{seA} essa solução de EM foi previamente autoclavada. As demais unidades experimentais de tratamentos que não receberam EM (S_{or} , S_{orA} e B_A) receberam quantidade equivalente de água destilada.

As plântulas de milho foram cultivadas durante 50 d.

3.7 Variáveis analisadas

3.7.1 No vaso (solo agroecológico e horizonte B latossólico)

Amostras do solo agroecológico e horizonte B dos tratamentos foram coletadas, secas e passadas em peneira de 2 mm (TFSA), quando necessário para fins de análises químicas, físicas e microbiológicas. As análises físicas e químicas foram realizadas, respectivamente, nos Laboratórios de Física do Solo e Análise de Rotina e Fertilidade do Solo, do Departamento de Solos (DPS), na Universidade Federal de Viçosa (UFV). As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Associações Micorrízicas, do Departamento de Microbiologia no BIOAGRO-UFV.

Análises químicas

A coleta de amostras para a caracterização química ocorreu 30 d após a montagem dos experimentos quando se finalizou a incubação e antes do plantio, bem como ao final do cultivo das plantas de milho. Para esta análise foram utilizadas amostras compostas, formadas a partir de amostras simples retiradas de cada unidade experimental de cada um dos tratamentos dos dois experimentos. Os dados obtidos foram comparados com a análise efetuada no solo agroecológico e horizonte B utilizados no experimento (Tabela 1).

As análises químicas efetuadas foram: pH em H₂O; K e P extraídos por Mehlich-1; Ca, Mg e Al extraídos com KCl 1 mol/L, matéria orgânica pelo método Walkley-Black e fósforo remanescente.

Análises físicas

A condutividade hidráulica não saturada (K) foi determinada em cada unidade experimental dos dois experimentos, aos 28 d de cultivo e 22 d antes da colheita, utilizando-se um mini infiltrômetro de disco da Decagon Devices® (Figura 3). No procedimento de determinação foram realizadas leituras a cada 30 s por um período de 5 min, quando se supôs atingir infiltração constante. Os dados coletados foram analisados em uma planilha fornecida pelo fabricante do equipamento, estimando assim o valor de K.



Figura 3: Avaliação da condutividade hidráulica não saturada com Mini infiltrômetro de disco nas unidades experimentais em casa de vegetação

Ao final do cultivo das plantas e por ocasião da colheita, amostras deformadas e indeformadas dos substratos de cada uma das unidades experimentais foram coletadas nos dois experimentos. As amostras deformadas foram previamente secas e passadas em peneira (TFSA) para as análises. As amostras indeformadas foram coletadas no interior de cada vaso com o uso de um amostrador. Anéis cilíndricos de inox de aproximadamente, 5 cm de altura e diâmetro foram utilizados neste procedimento.

Nas amostras deformadas foram determinados argila dispersa em água; condutividade elétrica, densidade de partículas e a avaliação da hidrofobicidade das amostras. Nas amostras indeformadas foram analisadas a condutividade hidráulica em meio saturado (K_0), microporosidade; porosidade total e densidade do solo. Todas as análises foram conduzidas segundo EMBRAPA (2017).

A argila dispersa em água (ADA) foi realizada com agitação rápida e utilizando-se o método da pipeta. A condutividade elétrica foi determinada em condutivímetro digital. Na determinação de densidade do solo (D_s) foi utilizado o

método do cilindro volumétrico. A densidade de partículas (D_p) foi obtida segundo o método do balão volumétrico e apenas para permitir o cálculo da porosidade total (PT), pela equação $PT = [1 - (D_s/D_p)]$. A microporosidade (M_i) foi obtida em extrator de Richards com manômetro digital e potencial de -6 KPa. A macroporosidade (M_a) foi determinada por diferença entre a porosidade total e a microporosidade ($M_a = PT - M_i$). Na avaliação da condutividade hidráulica em meio saturado foram utilizados frascos de Mariotte para manter a carga constante.

O teste de hidrofobicidade dos solos nos diferentes tratamentos foi efetuado utilizando-se o método do tempo de penetração de gotas de água ("*water drops penetration time*" ou WDPT) (MAIA et al., 2005). Uma gota de água é aplicada sobre o solo e mede-se o tempo que ela leva para penetrar na amostra. O grau de repelência segundo o tempo de infiltração foi atribuído de acordo com a classificação de Bisdom et al. (1993), como citado por Maia 2005: hidrofílico (< 5 s), levemente hidrofóbico (5 – 60 s), fortemente hidrofóbico (60 – 600 s), severamente hidrofóbico (600 – 3600 s) e extremamente hidrofóbico (> 3600 s).

Análises microbiológicas

Número de esporos de Fungos Micorrízicos Arbusculares

Amostras de cada unidade experimental dos dois experimentos foram coletadas logo após a colheita das plantas e armazenadas em freezer (-4 °C) para a quantificação de esporos de FMA. Nessa determinação foram utilizados 50 g de amostra e os esporos foram separados pelo método do peneiramento úmido (GERDEMANN e NICHOLSON, 1963). Neste procedimento, as amostras foram colocadas em recipiente contendo 1800 mL de água e a suspensão foi agitada manualmente durante 1 min. Após 10 s de decantação, o sobrenadante foi passado por um conjunto de duas peneiras de malhas 0,42 e 0,044 mm. No material decantado foi adicionado novos 1800 mL de água, promovida nova agitação de 1 min, esperado 10 s para decantação e o sobrenadante foi vertido sobre o mesmo conjunto de peneiras. Uma nova repetição deste procedimento foi executada e, ao final da passagem das três suspensões pelas peneiras, o material retido na peneira de 0,044mm foi lavado e transferido para um tubo Falcon® de 50 mL. Os tubos foram então centrifugados a 3.000 rpm por 5 min e

o sobrenadante foi descartado. No material decantado foi adicionado aproximadamente 25 mL de solução 50 % (m:v) de sacarose e promovida a agitação para a resuspensão. Os tubos foram então novamente centrifugados, agora a 1.000 rpm por 2 min. O sobrenadante foi transferido para uma peneira de malha 0,044 mm e o material retido foi lavado com pisseta para a eliminação da sacarose. O material lavado da peneira foi então transferido para tubos Falcon® de 50 mL, que tiveram volume completado até próximo de 20 mL. Essa suspensão foi vertida em placas canaletadas e, com o auxílio de um microscópio ótico de 40 vezes de aumento, promoveu-se a contagem de esporos.

Avaliação do perfil das comunidades microbianas por PCR-DGGE

Na avaliação das comunidades microbianas foram utilizadas amostras de solo coletada após o cultivo, que também foi utilizada na contagem do número de esporos. A amostra foi mantida em freezer (-4°C) até o momento das análises.

O primeiro procedimento analítico foi a extração de DNA nas amostras de solo, que foi realizada utilizando kit comercial NucleoSpin®soil (Macherey-Nagel), conforme recomendações do fabricante. As amostras do tratamento Horizonte BAUT necessitaram passar por repetidos procedimentos de extração para se obter DNA suficiente para prosseguimento das análises. O extrato líquido obtido nas extrações foi liofilizado e, na sequência, eluído para compor uma suspensão final de DNA. A avaliação da qualidade do DNA total obtido foi efetuada com eletroforese horizontal em gel de agarose (0,8%, m:v) e a quantificação do mesmo DNA foi realizada pela técnica da espectrofotometria UV em um equipamento Thermo®, modelo NanoDrop 2000.

Na sequência, alíquotas extraídas da suspensão de DNA total foram submetidas à reação em cadeia polimerase (PCR). Para avaliar o perfil da comunidade de bactérias foi amplificado região correspondente ao 16S rDNA, sendo utilizado os primers F27 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-') (DENG et al., 2007) originando um fragmento de 1500 pb. Para se obter um fragmento menor de DNA foi realizada uma *Nested* PCR utilizando-se os primers 1378R (5' -CGGTGTGTACAAGGCCCGGGA ACG-3') e 984F (5' -AACGCGAAGAACCTTAC-3') (HEUER et al., 1997) com grampo GC (MYERS et al., 1985) gerando ao final um fragmento com 180 pb.

Na análise do perfil da comunidade de fungos diversidade de fungos, foi utilizada região correspondente ao 18S rDNA, sendo utilizado os primers NS1 (5'-GTA GTC ATA TGC TCT TTG C-3') (WHITE et al., 1990) e EF3 (5'-TCC TCT AAA TGA CCA AGT TTG-3') (SMIT et al., 1999) gerando um fragmento de 1700 pb. A *Nested* PCR foi realizada utilizando os primers FR1-GC (5'-CCC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GCC GAI CCA TTC AAT CGG TAI T-3') e FF390 (5'- CGATAACGAACGAGACCT- ') (VAINIO & HANTULA, 2000), gerando ao final um fragmento de 350 pb.

Na avaliação da diversidade de fungos micorrízicos arbusculares, utilizou-se os primers AML1 (5'- GTTTCCTCGTAAGGCGCCGAA - 3') e AML2 (5' GAA CCC AAA CAC TTT GGT TTC - 3') (LEE et al., 2008) obtendo-se fragmentos de 580 pb. O procedimento *Nested* PCR foi efetuado com os primers NS31GC (5'- CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGTTGGAGGG CAAGTCTGGTGCC-3') (HELGASON et al., 1998) e Glo1 (5'- GCCTGCTTTAAACACTCTA- 3') (CORNEJO et al., 2004).

A mistura da primeira PCR foi preparada para um volume final de 50 µL, contendo 5 µL de DNA total; 2 µL de cada primer; 10 µL do tampão GoTaq Flex®Reaction Buffer; 2 µL de desoxinucleosídeos trifosfatados; 4 µL de MgCl₂ e 0,25 µL GoTaq Flex DNA polimerase (Promega, Madison, EUA) e água deionizada (Milli-Q) esterilizada para se atingir o volume final. Nos procedimentos de nested-PCR foram utilizadas alíquotas de 5 e 2 µL para bactérias e para fungos totais e fungos micorrízicos arbusculares, respectivamente.

As amplificações na primeira e segunda PCR foram realizadas em termociclador (Eppendorf Mastercycler ep Gradient). Na análise de bactérias foram utilizadas as seguintes condições operacionais: ciclo inicial de 94 °C a 4 min para a desnaturação inicial, seguida de 35 ciclos a 94 °C durante 30 s, 50 °C a 60 s, 72 °C a 90 s, e uma extensão final de 72 °C durante 7 min. Para fungos totais as condições foram: ciclo inicial de 94 °C a 4 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 60 s, 55 °C a 60 s, 72 °C a 120 s, e uma extensão final de 72 °C a 10 min. Para fungos micorrízicos arbusculares foi utilizado um ciclo de 94 °C a 60 s, seguido de 30 ciclos a 50 °C pro 60 s, 72 °C a 60 s, e uma extensão final de 72 °C por 10 min. Para *Nested* PCR foram utilizadas as seguintes condições: 94 °C a 5 min, seguido de 20 ciclos a 94°C a 60 s, 53°C a 60 s, 72°C a 2 min e

extensão final de a 72°C a 10 min., A segunda PCR para FMA teve as seguintes condições de amplificação: 94 °C a 5 min, seguido de 35 ciclos a 94°C a 45 s, 52°C a 60 s, e 30 min de extensão a 72°C.

Para confirmar a presença dos produtos da PCR (primeira reação) e da *Nested* PCR (segunda reação), 5 µL foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (1,5 % m:v a 80 V por 80 min), corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV em sistema fotodocumentador (Loccus Biotecnologic L-Pix Chemi).

A partir dos produtos obtidos na *Nested* PCR para fungos e bactérias totais e FMA, promoveu-se a análise pela técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). Uma alíquota de 20 µL produto da *Nested* PCR foi aplicada em gel de poliacrilamida a 8 % (m/v) em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X (Tris/ácido acético/EDTA, pH 8,0). O gel foi preparado em gradiente de desnaturação variando de 35 a 55 %, sendo a condição de 100 % de desnaturação composta de ureia 7 mol/L e formamida a 40 % (v/v). O gel foi submetido a eletroforese vertical a 100 V por 12 h a 60 °C. Após o término da eletroforese, os géis foram corados por 20 min em solução 1X de SYBR GOLD® (Sigma Aldrich), conforme recomendações do fabricante. As imagens dos géis foram observadas sob luz UV, capturadas e digitalizadas no mesmo fotodocumentador indicado previamente.

A análise dos agrupamentos microbianos dos solos em diferentes condições de manejo foi realizada com auxílio do software Bionumerics®, que permitiu a construção de dendrogramas para se avaliar o grau de similaridade entre as comunidades analisadas.

Foram calculadas as binárias e intensidade das bandas de cada gel permitindo a construção dos dendogramas. Esses dados foram processados com o uso do PAST (HAMMER et al., 2001) para calcular os seguintes índices:

- a) índice de diversidade de Shannon: avalia a diversidade de espécies, sendo o valor zero atribuído à presença de apenas uma espécie e valores maiores a maior diversidade de espécies (MAGURRAN, 1988);
- b) índice de dominância de Simpson: avaliar a probabilidade de dois indivíduos, selecionados ao acaso, pertencerem à mesma espécie (BROWER & ZARR, 1984) e varia de zero a um, sendo o valor zero atribuído a grande diversidade de espécies e o valor um ao domínio de apenas uma espécie;

c) índice de riqueza de Chao-1: avalia a riqueza total de espécies de acordo com a abundância (DIAS, 2004), sendo quanto maior, maior é essa riqueza.

3.7.2 Na Planta

Altura da planta

Durante o cultivo do milho foram realizadas medidas da altura das plantas com o auxílio de uma fita métrica nas unidades experimentais dos dois experimentos. A distância entre a superfície do solo e a folha do ápice foram tomadas aos 15, 20, 30, 40 e 50 d após o plantio.

Massa fresca e Massa seca

Após a colheita das plantas aos 50 d de cultivo, a parte aérea do milho foi submetida à pesagem para a obtenção da massa fresca (MFPA) nos tratamentos dos dois experimentos. Na sequência, foi transferida para sacos de papel e levada para estufa à temperatura aproximada de 60°C até massa constante para a obtenção da matéria seca da parte aérea (MSPA).

Adsorção de P

Subamostras do tecido vegetal foram moídas para avaliação dos teores de P em ambos os experimentos. O material foi previamente digerido em solução nitroperclórica e os teores foram determinados por colorimetria (TEDESCO et al., 1995). As análises foram realizadas no Laboratório de Análise de Plantas do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa.

3.8 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram inicialmente analisados para avaliação da Análise de Variância. Na sequência, as médias dos atributos avaliados nos diferentes tratamentos foram comparados pelo teste de média Tukey ($p < 0,10$). Cada experimento foi analisado separadamente e, em todos os procedimentos foi utilizado o Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2011).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização química do solo

A caracterização química das amostras de solo ocorreu antes, após a incubação dos tratamentos (antes do plantio) e ao final do cultivo das plantas de milho (Tabela 3). Os teores iniciais (antes do experimento) referem-se à análise das amostras do solo agroecológico (utilizadas em S_{or} e S_{orA}) e do horizonte B (usadas em B_{se}, B_{seA} e B_A), como indicado na caracterização dos solos (Tabela 1).

Os atributos químicos separam dois grupos de solos, como era de esperar, os solos sob manejo agroecológico do horizonte B de baixa fertilidade natural. Os solos sob manejo agroecológico apresentam as melhores características químicas.

A eliminação da microbiota nativa pelo processo de autoclavagem e a aplicação de EM praticamente não alteraram as características químicas dos solos, como se pode ver pela comparação entre os valores de antes do experimento e aos 30 dias entre (S_{or}) e (S_{orA}) e entre (B_{se}) e (B_{seA}). Por sua vez, a adição da serapilheira aumentou um pouco os teores de K, Ca, Mg, matéria orgânica e P-rem do solo, como indicado pela comparação dos valores aos 30 dias de B_{se} e B_{seA} em relação a B_A (que não recebeu serapilheira). Efeitos positivos da aplicação de serapilheira na fertilidade do solo costumam ser verificados, como é o caso do estudo de Soumare et al. (2002) que fez a adição do material na cultura do tomate.

Após 50 d de cultivo algumas alterações nos atributos químicos foram percebidas, embora sem diferenças significativas ao nível de 10% de significância, mas sem um padrão mais consistente que permitisse maiores considerações. Obviamente que o período de incubação (30 d) e de cultivo (50 d) constituem um intervalo de tempo pequeno para se esperar modificações mais pronunciadas nos atributos químicos do solo, como destacado por Marin (2002). Este autor salienta que mudanças em variáveis químicas do solo em razão do manejo dependem de um tempo maior de imposição de tratamentos, sugerindo que se considere ao menos 10 anos de intervalo para que sejam melhor avaliadas alterações.

Tabela 3: Caracterização química de rotina de amostras compostas referentes aos tratamentos utilizados em diferentes épocas do cultivo de milho em casa de vegetação

		pH	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	CTCef.	MO	P-rem
Momento		dag/k								
(1)		(H ₂ O)	mg/dm ³		-----	cmol _c /dm ³	-----		g	mg/L
Experimento 1										
S _{or}	Antes	5,39	14,1	274	5,70	1,14	0	7,54	10,46	12,0
	30 dias	5,62	7,1	194	4,44	1,62	0	6,56	8,49	21,6
	Colheita	5,75	10,1	152	4,86	1,90	0	7,15	9,84	13,3
S _{orA}	Antes	5,39	14,1	274	5,70	1,14	0	7,54	10,46	12,0
	30 dias	5,72	6,1	207	4,59	1,71	0	6,83	7,60	27,9
	Colheita	5,67	8,4	163	5,00	1,95	0	7,37	9,71	15,1
Experimento 2										
B _{se}	Antes	4,73	0,4	0	0,13	0,03	0,1	0,26	0,76	4,9
	30 dias	5,13	0,2	23	0,63	0,22	0,2	1,10	3,30	11,9
	Colheita	5,09	0,7	12	0,80	0,22	0,2	1,25	2,66	12,0
B _{seA}	Antes	4,73	0,4	0	0,13	0,03	0,1	0,26	0,76	4,9
	30 dias	5,02	0,4	22	0,57	0,22	0,3	1,13	2,53	16,3
	Colheita	5,41	0,8	34	1,34	0,27	0	1,70	2,93	11,9
B _A	Antes	4,73	0,4	0	0,13	0,03	0,1	0,26	0,76	4,9
	30 dias	4,94	0,1	3	0,23	0,04	0,2	0,47	1,39	9,1
	Colheita	5,60	0,6	9	0,89	0,05	0	0,96	0,80	6,9

(1) Antes: amostras de solo agroecológico (S_{or} e S_{orA}) e do horizonte B (B_{se}, B_{seA} e B_A), conforme consta da caracterização dos solos (Tabela 1) executada previamente à montagem dos tratamentos; 30 dias: amostras compostas coletadas 30 dias após o preparo das misturas e logo antes do plantio; Colheita: amostras compostas coletadas no momento da colheita das plantas de milho.

4.2 Caracterização física do solo

A caracterização física das amostras de solo ao final do cultivo das plantas de milho (Tabela 4) indicou não haver, de forma geral, efeito dos tratamentos nas variáveis analisadas nos dois experimentos. Embora não comparados

estatisticamente, algumas diferenças são notadas quando se compara o uso de solo agroecológico ou horizonte B nos tratamentos impostos, pela grandeza das variáveis analisadas. Este é o caso da condutividade hidráulica em meio saturado, argila dispersa em água e condutividade elétrica. Para todas essas variáveis as amostras dos tratamentos com solo agroecológico (Experimento 1) superaram os valores observados nas amostras nos tratamentos com horizonte B (Experimento 2). A justificativa para isto pode ser associada aos maiores teores de matéria orgânica no solo agroecológico, e consequentemente os teores de glomalina no solo aumentando a agregação de partículas, a estabilidade de agregados do solo e o estoque de carbono contribuindo para melhoria da qualidade do solo (SOUZA et al., 2012) (Tabela 1). Desta forma e, respectivamente, associada às variáveis comentadas, a matéria orgânica pode favorecer a infiltração da água no solo; pode em determinadas situações aumentar a dispersão pelo incremento de cargas negativas no sistema e; com sua mineralização colocar em solução mais elementos químicos.

Especificamente no experimento 1, com solo sob manejo agroecológico, a remoção da microbiota nativa não afetou a condutividade hidráulica em meio saturado (K_0), macroporosidade, microporosidade, porosidade total, densidade do solo, argila dispersa em água e condutividade elétrica (Tabela 4). Efeito apenas foi identificado na condutividade hidráulica não saturada (K), que é dependente da capacidade de infiltração da água no solo. O solo autoclavado e, portanto, sem a presença de microrganismos, apresentou condutividade hidráulica não saturada coerente com a observação visual em casa de vegetação de maior infiltração da água no solo no momento das irrigações e maior demanda de irrigação nesses vasos. A autoclavagem poderia ter reduzido a hidrofobicidade do solo, permitindo maior infiltração da água do solo. Entretanto, isso não ocorreu, pois o teste WDPT, indicou a completa infiltração da gota de água com menos de um segundo para todas amostras de ambos os experimentos. Ou seja, todos os materiais de solo, independente dos tratamentos a que foram submetidos, foram classificados como hidrofílicos.

No experimento com horizonte B, os tratamentos influenciaram a microporosidade do solo (Tabela 4), sendo constatado apenas o aparente efeito da remoção dos microrganismos com a autoclavagem na redução desse atributo do solo.

Tabela 4: Características físicas dos solos avaliadas nos tratamentos estudados após colheita do milho

	K ₀	K	Ma	Mi	PT	Ds	ADA	CE
	----- cm/s -----	-----	-----	m ³ /m ³ -----	-----	kg/dm ³	kg/kg	µS/cm
Experimento 1								
S _{or}	0,013	0,0007 b	0,24	0,38	0,62	0,97	0,12	256,3
S _{orA}	0,016	0,0013 a	0,22	0,40	0,62	0,95	0,12	270,2
p-Valor	ns	0,0092	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)	86,7	27,4	33,4	6,9	8,7	14,6	16,5	17,4
Experimento 2								
B _{se}	0,005	0,0006	0,26	0,39 a	0,65	0,94	0,010	122,6
B _{seA}	0,005	0,0006	0,26	0,34 b	0,60	1,01	0,006	122,5
B _A	0,002	0,0070	0,32	0,36 ab	0,68	0,87	0,006	115,0
p-Valor	ns	ns	ns	0,0865	ns	ns	ns	ns
CV (%)	61,9	46,0	25,4	7,4	9,6	14,7	61,0	15,1

K₀ = condutividade hidráulica em meio saturado; K = condutividade hidráulica em meio não saturado; Ma = Macroporosidade; Mi = Microporosidade; PT = Porosidade Total; Ds = Densidade do Solo; ADA = Argila Dispersa em Água; CE = Condutividade Elétrica. Médias na mesma coluna seguidas por mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey (p<0,10).

Diante do exposto, pode-se afirmar que no tempo de avaliação não houve efeito da aplicação de EM e serapilheira, bem como da exclusão da microbiota nativa do solo, nas características físicas dos substratos. O tempo de imposição dos tratamentos limita a observação de efeitos nos atributos físicos, ainda que à introdução de material orgânico no solo seja frequentemente relacionada à melhoria da sua qualidade física. Neste sentido, Karami et al. (2012) verificaram que, independente da fonte e da quantidade, a adição por três anos consecutivos

de matéria orgânica foi capaz de incrementar a taxa de infiltração de solos, o que ocorre devido a efeito na melhoria da macroporosidade do solo. Por outro lado, o mesmo tempo de três anos não foi suficiente para Nascimento et al. (2005) observarem diferenças nos atributos físicos do solo avaliado.

4.3 Caracterização microbiológica do solo

4.3.1 Abundância de esporos de FMA

Houve maior abundância de esporos de fungos micorrízicos arbusculares no solo agroecológico (S_{or}) do que no horizonte B (B_A) (Tabela 5). Isto era esperado em função da pouca atividade biológica no horizonte subsuperficial, como indicado por Loss et al. (2009), que associam a maior quantidade de esporos ao maior teor de matéria orgânica e à diversidade de plantas na área. O manejo agroecológico condiciona menor ocorrência de erosão, evitando perdas de nutrientes e matéria orgânica. O maior aporte de matéria orgânica e a restrição luminosa nos sistemas arborizados podem ser relacionados à maior ocorrência dos FMA (BONFIM et al., 2010).

Considerando os dois experimentos, enquanto no primeiro a autoclavagem reduziu o número de esporos no solo sob manejo agroecológico, no segundo o mesmo procedimento não alterou a quantidade de esporos no horizonte B que recebeu serapilheira e EM (comparação entre B_{se} e B_{seA}). A autoclavagem no solo sob manejo agroecológico matou os esporos de algumas espécies de FMA e os que restaram não foram capazes de colonizar as plantas e recuperar a abundância de esporos no período que se sucedeu à autoclavagem. No segundo experimento, o incremento do número de esporos nos tratamentos B_{se} e B_{seA} em relação ao horizonte B autoclavado (B_A) deve-se essencialmente à adição de serapilheira e maior crescimento de plantas. A comparação entre o tratamento autoclavado (B_{seA}) e não autoclavado (B_{se}) indicam que o procedimento da autoclavagem provavelmente não afetou o número de esporos de FMAs introduzida pela serapilheira, não sendo verificado, portanto, diferenças entre esses tratamentos.

Tabela 5: Número de esporos totais de fungos micorrízicos arbusculares nos diferentes tratamentos avaliados após a colheita do milho

Experimento 1				Experimento 2				
	S _{orA}	p-Valor	CV (%)	B _{se}	B _{seA}	B _A	p-Valor	CV (%)
162,2a	64,8b	0,0101	40,5	42a	43a	7,4b	0,0004	36,6

Tratamentos: Solo sob manejo agroecológico (S_{or}), Solo sob manejo agroecológico autoclavado (S_{orA}), Horizonte B autoclavado, com serapilheira e EM (B_{se}), Horizonte B autoclavado, com serapilheira e EM autoclavado (B_{seA}) e Horizonte B autoclavado (B_A). Médias na mesma linha dentro de cada experimento e seguidas por mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey (p<0,10)

4.3.2 Caracterização do perfil microbiano pela técnica PCR-DGGE

A técnica de PCR-DGGE permitiu avaliar a comunidade microbiana dos dois experimentos analisados. Os resultados foram obtidos a partir da avaliação da presença ou ausência de bandas correspondentes a fragmentos de DNA em todos os tratamentos analisados em referência a três diferentes comunidades microbianas: bactérias, fungos e fungos micorrízicos arbusculares.

No experimento 1, a análise de agrupamento mostra que a comunidade bacteriana do solo foi formada por dois grupos distintos (Figura 4a), um primeiro com 67 % de similaridade e um segundo grupo com 68 % de similaridade. Entretanto, os dois grupos não permitiram separar os dois tratamentos avaliados (S_{or} e S_{orA}), indicando que o procedimento de autoclavagem (S_{orA}) não foi suficiente para eliminar toda a população de bactérias do solo. Um grupo formado pelas repetições 1, 2 e 3 e outro grupo pelas repetições 4 e 5. Talvez a posição dos vasos na casa de vegetação, onde os blocos 4 e 5 estavam mais próximos da janela e os demais mais ao centro tenha alterado o resultado.

a



b

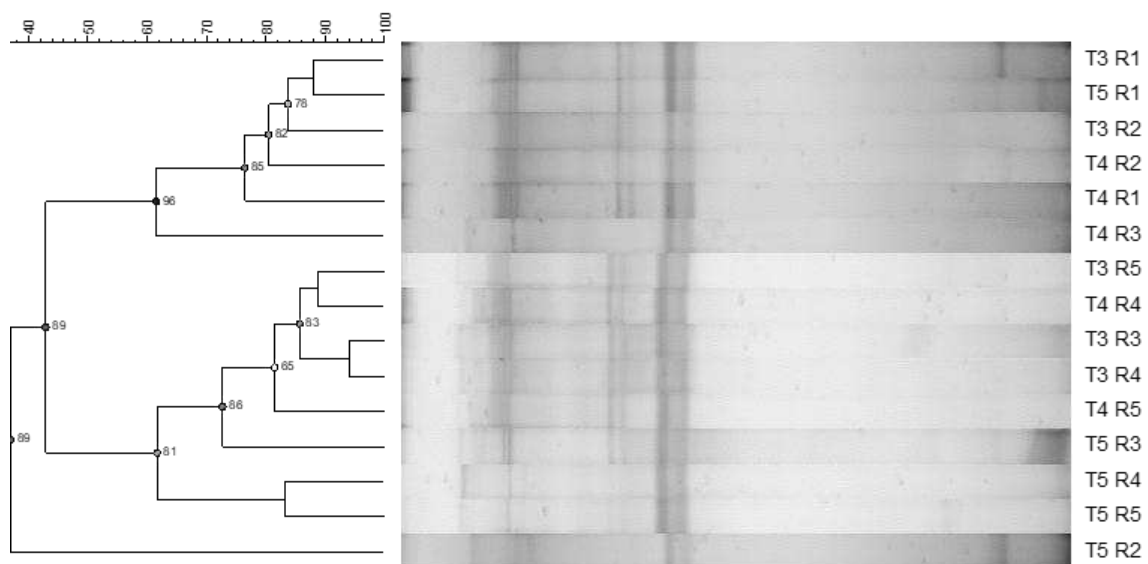


Figura 4: Análise de agrupamento (Dice-UPGMA) obtido pelo perfil de banda de DGGE da comunidade de bactérias para os tratamentos dos experimentos 1 (a) e 2 (b) dos tratamentos: S_{or} (T1), S_{orA} (T2), B_{se} (T3), B_{seA} (T4) e B_A (T5).

Os DNA de bactérias que permaneceram no solo após a autoclavagem pode ter recomposto parte da microbiota. Carini et al. (2016) observaram que, em média, 40% do DNA extraído do solo foram de células não viáveis, ou seja, de uma comunidade microbiana não ativa. O DNA pode permanecer no solo por anos influenciando análises como a diversidade da comunidade microbiana do

solo. Neste caso, mesmo com a autoclavagem, o DNA permaneceu no solo, sendo quantificado nas extrações que foram realizadas.

No experimento 2, a comunidade bacteriana do solo formou três grupos distintos (Figura 4b). Os dois primeiros apresentam uma similaridade próxima de 62 %, enquanto o terceiro foi formado apenas por uma repetição do tratamento com horizonte B (B_A). Ou seja, o agrupamento não permitiu a distinção de tratamento entre grupos, sugerindo que adição de EM e serapilheira sobre a composição bacteriana do solo não alterou o perfil da comunidade. Shin et al. (2017) também não verificaram efeitos da esterilização e adição de microrganismos EM na diversidade de bactérias em solo.

Na avaliação do agrupamento da comunidade de fungos (Figura 5a) do experimento 1, houve a formação de três grupos, dois com pelo menos 96% de similaridade e um com mais de 94 % de similaridade. Em termos gerais, o primeiro grupo foi formado basicamente pelo solo sob manejo agroecológico não autoclavado (S_{or}), o segundo por repetições do solo sob manejo agroecológico sem (S_{or}) e com (S_{orA}) autoclavagem, e o terceiro grupo por repetições do tratamento autoclavado (S_{orA}). A autoclavagem mostrou-se, pelo menos em parte, capaz de diferenciar a comunidade de fungos dos dois tratamentos avaliados. Disto resulta a possibilidade de autoclavagem ter alterado a composição dos fungos do solo.

No experimento 2, houve a formação de dois grupos com pelo menos 96 % de similaridade (Figura 5b). Neste caso, não se verificaram grandes distinções entre grupos, havendo repetições de todos os tratamentos (B_{se}, B_{seA} e B_A) em ambos os grupos. Isto leva à suposição que a adição de microrganismos eficientes e serapilheira não é capaz de alterar a comunidade de fungos do solo ou que microrganismos que sobreviveram à autoclavagem foram capazes de recompor essa comunidade no solo. Com a adição da serapilheira esperava-se alteração da composição da comunidade de fungos, como indicado por Costa (2015), que observaram diversidade expressiva desses microrganismos neste componente de solos manejados em sistemas agroflorestais.

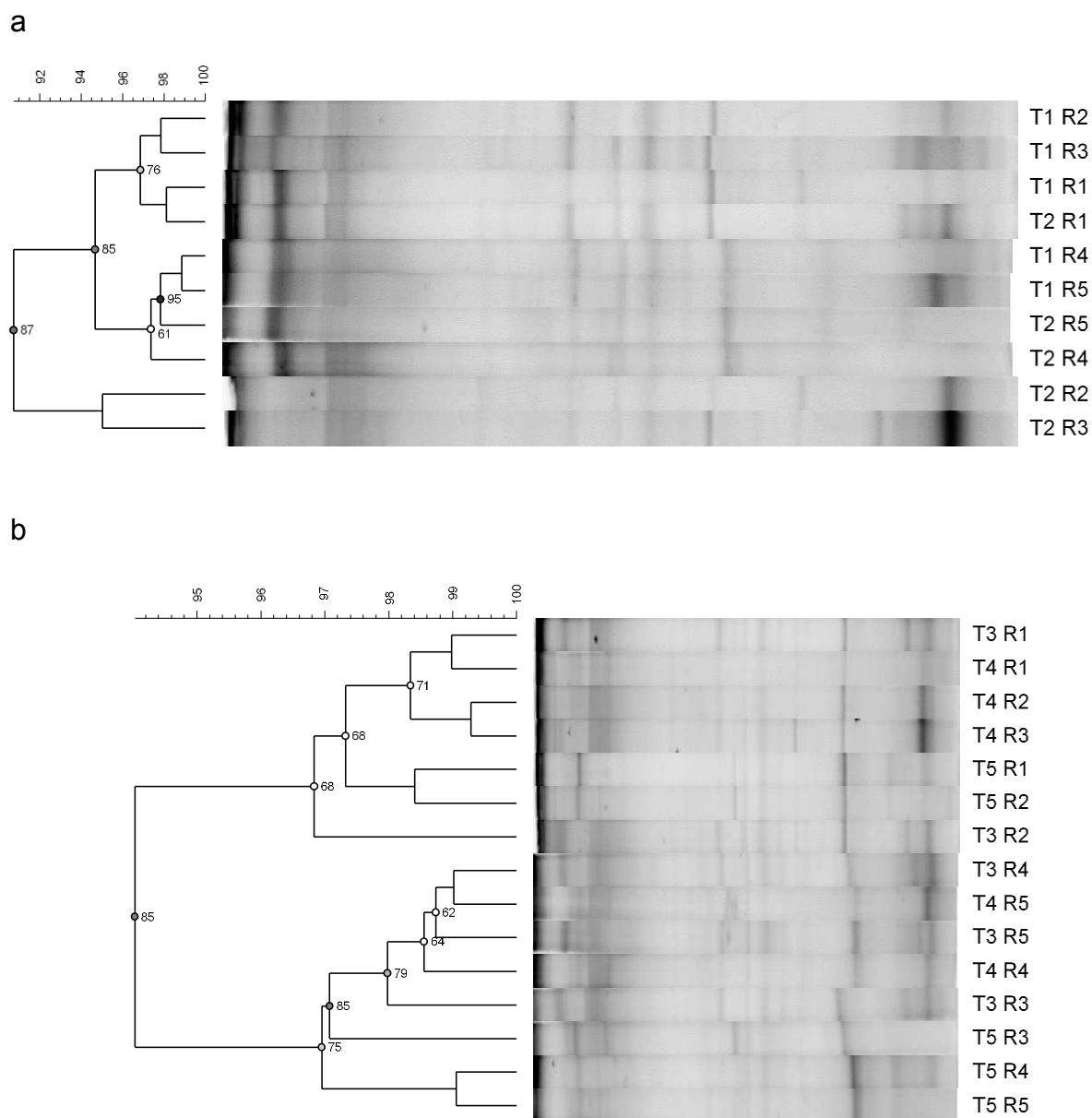


Figura 5: Análise de agrupamento (Cosine-UPGMA) obtido pelo perfil de banda de DGGE da comunidade de fungos para os tratamentos dos experimentos 1 (a) e 2 (b) dos tratamentos: S_{or} (T1), S_{orA} (T2), B_{se} (T3), B_{seA} (T4) e B_A (T5).

Na análise de agrupamento da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares do experimento 1 (Figura 6a), nota-se predomínio do agrupamento das repetições do tratamento do solo agroecológico (S_{or}) na parte de cima e do mesmo solo autoclavado (S_{orA}) na parte de baixo do dendrograma. Neste caso, houve a formação de dois grupos, com índice de similaridade de apenas 20 % entre grupos. Ainda que com menor similaridade, a autoclavagem parece ser capaz de alterar a composição dos FMAs nos solos.

No caso do agrupamento dos fungos micorrízicos arbusculares do experimento 2 (Figura 6b), houve a formação de dois grupos, entretanto, com grande dificuldade de agrupar os diferentes tratamentos (B_{se} , B_{seA} e B_A) em algum dos grupos, indicando novamente que a adição dos EM e da serapilheira não foi capaz de alterar o perfil da comunidade de FMAs do solo.

Os dendrogramas obtidos apresentam uma tendência de agrupamento mais homogênea das comunidades microbiológicas, ou seja, sem indicar efeito mais claro dos tratamentos impostos, principalmente para o experimento 2. No experimento 1, a autoclavagem afetou pouco a comunidade bacteriana, mas, por outro lado, foi mais eficiente em diferenciar os tratamentos quando fungos e FMAs foram avaliados.

No caso do experimento 2, a não formação de grupos claros em função dos tratamentos avaliados indica que a comunidade microbiana não foi muito afetada pela imposição dos tratamentos, o que não era esperado. A execução da autoclavagem e a adição de EM e serapilheira são potencialmente capazes de promover alterações nos microrganismos do solo. Do ponto de vista microbiológico, os microrganismos são considerados mortos quando perdem a capacidade de se multiplicar. O método mais utilizado para eliminar os microrganismos é o calor, por ser barato, eficiente e prático. O calor úmido mata os microrganismos, sendo a autoclavagem o processo que viabiliza esta condição de temperaturas elevadas obtidas por vapor sob pressão, e a taxa de destruição de microrganismos durante o processo de autoclavagem é rápida (TORTORA et al., 2005; TRABULSI & ALTERTHUM, 2005).

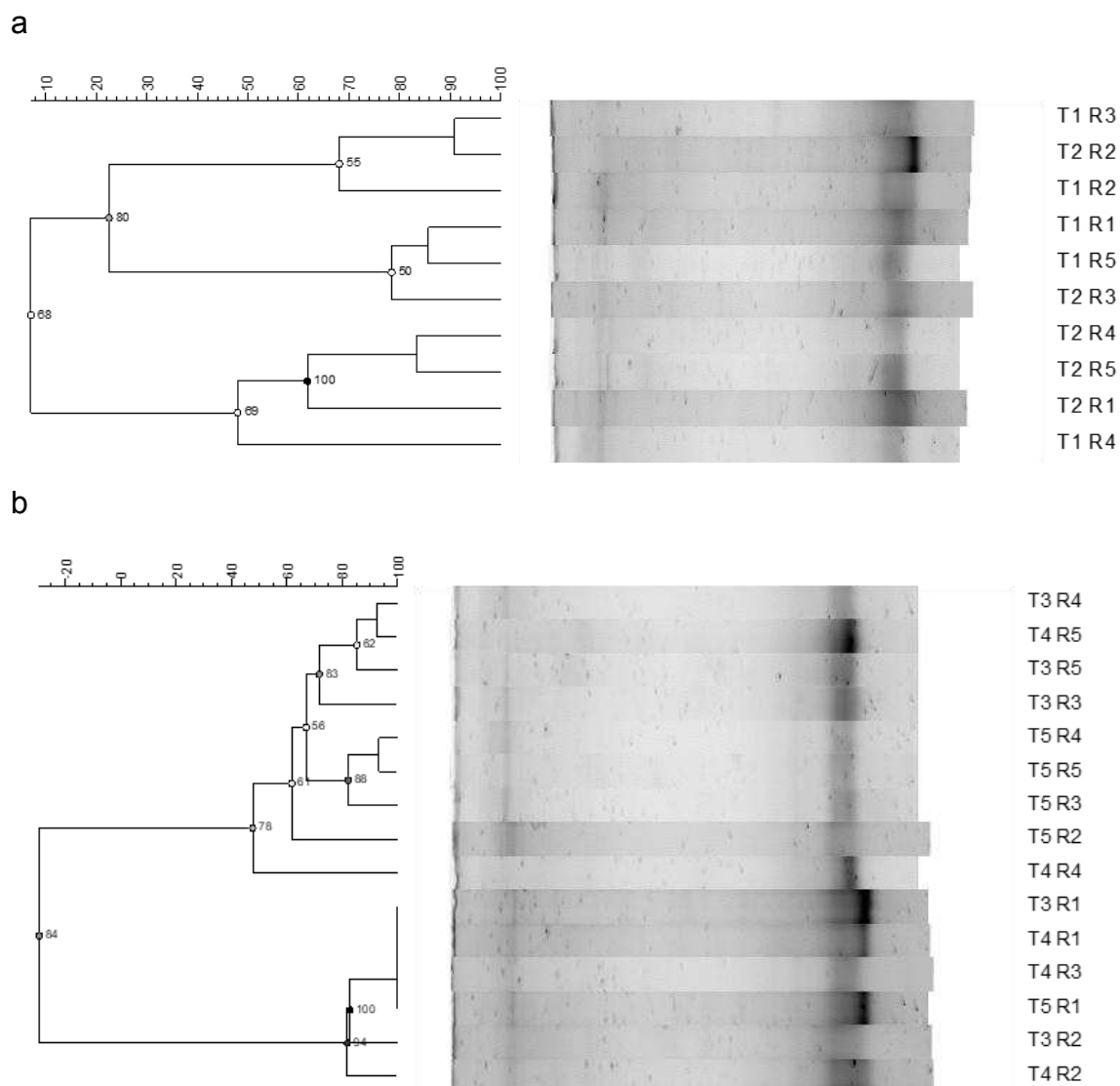


Figura 6: Análise de agrupamento (Dice-Ward) obtido pelo perfil de banda de DGGE da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares para os tratamentos dos experimentos 1 (a) e 2 (b) dos tratamentos: S_{or} (T1), S_{orA} (T2), B_{se} (T3), B_{seA} (T4) e B_A (T5).

Em trabalho realizado por Mazaro et al. (2007), a autoclavagem utilizando as mesmas condições operacionais deste trabalho mostrou ser eficiente para a esterilização de substratos. Desta forma, entende-se ter havido algum problema na execução da técnica, o que foi associado ao pouco material de DNA disponível nas amostras de solo do referido experimento. Isto conduziu à realização de repetidas extrações para a obtenção de DNA suficiente para a realização da PCR, em especial nos tratamentos B_{seA} e B_A, para os quais, respectivamente, quase a totalidade (80 %) ou mesmo a totalidade das

repetições tiveram que passar por sucessivas extrações. Este esforço para se obter DNA suficiente para a PCR pode ter reduzido a capacidade de discriminação dos tratamentos B_{se}, B_{seA} e B_A, por ter aumentado a presença de DNA microbiano nos dois últimos tratamentos devido extrações adicionais. Nos tratamentos S_{or}, S_{orA} e B_{se} não foram necessárias nenhuma repetição de extração.

A diversidade de microrganismos baseada em PCR-DGGE também foi pouco afetada pela autoclavagem e adição de serapilheira e EM (Tabela 6). Os tratamentos impostos nos dois experimentos não evidenciaram alterações na diversidade da comunidade microbiana pelos índices de diversidade (Simpson, Shannon, Chao-1), como indicado pelo Teste t para a avaliação de diferenças entre tratamentos. A ausência de efeito no perfil da comunidade microbiana revelada por PCR-DGGE, discutida previamente foi reforçada nos cálculos dos índices, que são efetuados a partir das bandas de DNA.

No caso do experimento 1, a semelhante na diversidade microbiológica dos tratamentos S_{or} e S_{orA} do experimento 1 pode ser associada às estruturas de DNA não viáveis como sugerido por Carini et al. (2016) amplificadas por PCR. A mesma semelhança na diversidade de microrganismos em B_{se}, B_{seA} e B_A do experimento 2 podem ser associados novamente aos esforços repetitivos de extração de DNA nos dois tratamentos autoclavados (B_{seA} e B_A) e à mesma presença de DNA de células mortas que pode ser amplificado e aparecer como banda no gel.

Dentre os grupos de microrganismos, a menor dominância por poucas espécies foi verificada para o grupo dos fungos micorrízicos arbusculares nos dois experimentos, indicando maior ocorrência de diferentes espécies de FMA dominando no solo agroecológico e no horizonte B.

Os valores dos índices de Shannon indicam menor diversidade de espécies de fungos micorrízicos arbusculares no experimento 1 e de fungos totais no experimento 2. As bactérias estão presentes com alta diversidade tanto no solo agroecológico como no horizonte B.

A maior riqueza de microrganismos pelo índice Chao-1 foi associada à comunidade dos fungos totais em ambos os experimentos, ficando os fungos micorrízicos arbusculares como apresentando o menor número total de espécies tanto no solo agroecológico como no horizonte B.

Tabela 6: Índices de diversidade dos microrganismos nos dois experimentos avaliados

Índices de dominância, diversidade e riqueza de espécies							
	Simpson	Shannon	Chao		Simpson	Shannon	Chao
Experimento 1				Experimento 2			
Bactérias							
S _{or}	0,89	2,2	49	B _{se}	0,90	2,3	54
S _{orA}	0,90	2,3	65	B _{seA}	0,89	2,2	48
				B _A	0,87	2,1	40
p-valor	0,63	0,51	0,34	p-valor	0,32	0,41	0,59
CV(%)	2,4	9,2	42,3	CV(%)	3,2	10,9	42,6
Fungos							
S _{or}	0,92	2,5	105	B _{se}	0,92	2,6	110
S _{orA}	0,93	2,6	123	B _{seA}	0,93	2,7	120
				B _A	0,90	2,3	68
p-valor	0,53	0,60	0,74	p-valor	0,12	0,12	0,16
CV(%)	7,6	16,9	43,5	CV(%)	6,3	16,6	54,0
Fungos Micorrízicos Arbusculares							
S _{or}	0,77	1,5	15	B _{se}	0,81	1,7	18
S _{orA}	0,81	1,7	18	B _{seA}	0,78	1,5	15
				B _A	0,84	1,9	28
p-valor	0,34	0,40	0,59	p-valor	0,19	0,16	0,12
CV(%)	2,5	12,4	68,8	CV(%)	2,7	10,9	45,8

Tratamentos: Solo sob manejo agroecológico (S_{or}), Solo sob manejo agroecológico autoclavado (S_{orA}), Horizonte B autoclavado, com serapilheira e EM (B_{se}), Horizonte B autoclavado, com serapilheira e EM autoclavado (B_{seA}) e Horizonte B autoclavado (B_A). p: probabilidade na avaliação de diferenças entre tratamentos pelo Teste t. CV(%): coeficiente de variação

O mesmo solo agroecológico foi avaliado previamente por Silva (2017). Na oportunidade, a autora verificou índice de riqueza (Chao-1) para bactérias e fungos em torno de 1100 e 91, respectivamente. No presente estudo, a riqueza para bactérias foi reduzida sensivelmente enquanto para fungos aumentou um pouco. Uma diferença de manejo separa os dois momentos de coleta, uma vez que a aplicação de cama de frango era frequente no estudo anterior e não mais ocorre. Do exposto pode-se sugerir o favorecimento das bactérias no solo com a aplicação do referido material orgânico. Este possível efeito da cama de frango encontra coerência quando se analisa a diversidade também avaliada pela mesma autora indicada. Os valores do índice de Shannon para bactérias caíram de 3,85 para 2,2 e, para fungos de 2,66 para 2,5, quando se compara os dados de Silva (2017) e os do presente estudo, respectivamente. Novamente nota-se o efeito da cama de frango por parte da comunidade bacteriana.

O manejo do solo e das culturas pode influenciar as dinâmicas populacionais de organismos do solo (GLIESSMANN, 2000), podendo inclusive reduzir a diversidade de espécies (ODUM, 1988). No experimento 2, no qual foram introduzidos componentes que podem ser utilizados no manejo de solos (serapilheira e EM), a ausência de diferenças entre tratamentos sobre os índices de dominância, diversidade e riqueza dos microrganismos pode ser relacionado ao pouco tempo de incubação, que pode não ter sido suficiente para promover alterações na comunidade microbiana.

4.4 Análise de plantas

A maior produção de massa seca e altura de plantas foi obtida no tratamento com solo sob manejo agroecológico (S_{or}), como evidenciado no registro fotográfico das plantas ao final do experimento (Figura 7). Ganhos de produção em sistemas agroecológicos têm sido obtidos, como no estudo de Massad et al. (2014), que observaram maior crescimento em altura de plantas de milho e ganhos de biomassa em comparação ao manejo convencional do solo.

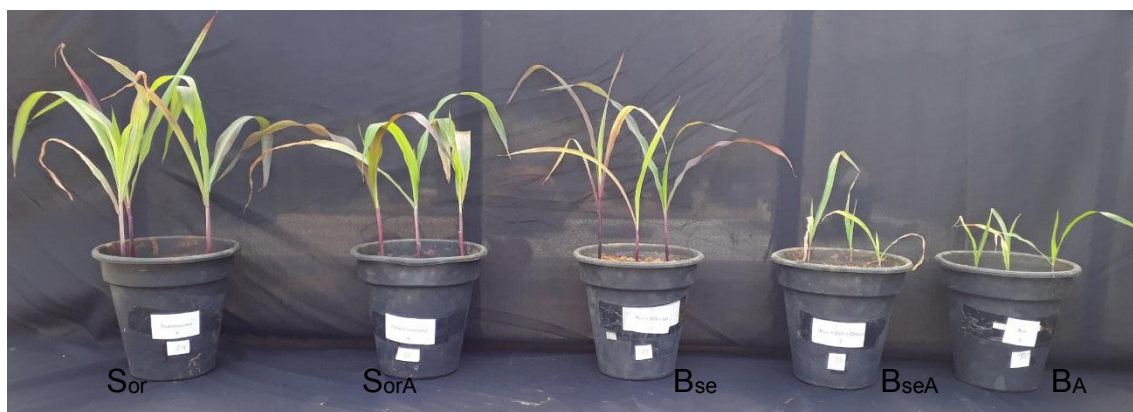


Figura 7: Milho após 50 d de cultivo com os tratamentos: Solo sob manejo agroecológico (S_{or}), Solo sob manejo agroecológico autoclavado (S_{orA}), Horizonte B autoclavado, com serapilheira e EM (B_{se}), Horizonte B autoclavado, com serapilheira e EM autoclavado (B_{seA}) e Horizonte B autoclavado (B_A).

No experimento 1, no solo sob manejo agroecológico, a altura (Figura 8a) e a produção de massa fresca e seca (Tabela 7) foram maiores no solo não autoclavado. Maior crescimento do milho cultivado no solo não autoclavado foi verificado nos últimos dias de cultivo (Figura 7), e a massa fresca e seca (biomassa) foram 1,6 vez maior quando a microbiota (solo não autoclavado) foi preservada, em comparação com o solo autoclavado (Tabela 7).

A adição de serapilheira e EM em horizonte B promoveu ganhos de aproximadamente seis vezes na altura (Figura 8b) e de aproximadamente cinco vezes na produção de massa fresca e seca do milho (Tabela 7) em relação ao solo autoclavado (Tabela 7). Apenas a adição de matéria orgânica (serapilheira) sem a presença de microrganismos não teve o mesmo efeito, pois os ganhos em altura e produção biomassa foram iguais no tratamento sem adição de serapilheira e autoclavado (Tabela 7, Figura 7). Os dados indicam que os EM contribuem com o desenvolvimento vegetal, como verificado por Santos (2016). Este autor observou incrementos no crescimento e produção de biomassa de capim marandú quando esses microrganismos foram inoculados na semente da forrageira e cultivados na ausência de esterco. O efeito positivo dos EM no desenvolvimento vegetal pode ser associado a vitaminas, hormônios e enzimas nele presentes (HIGA, 2000).

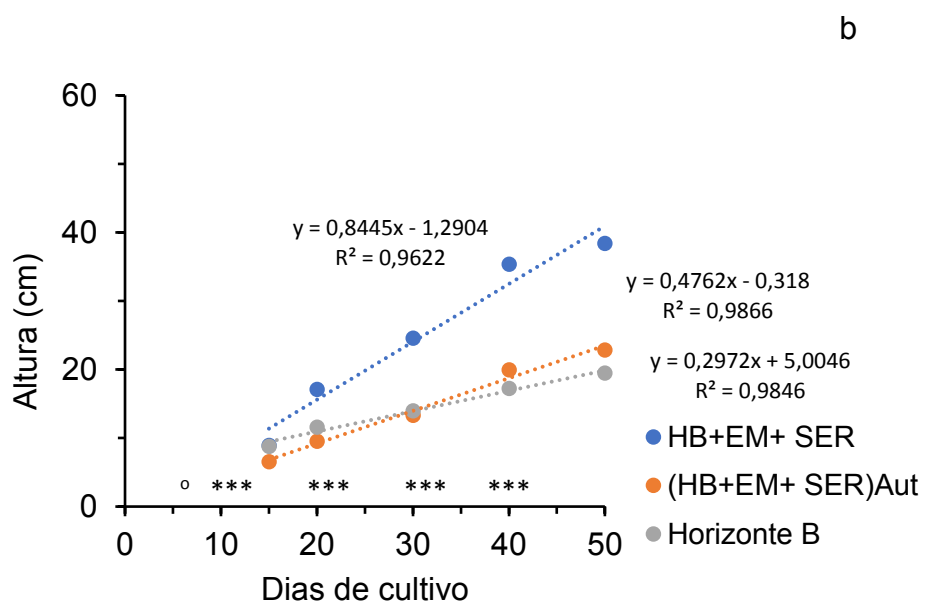
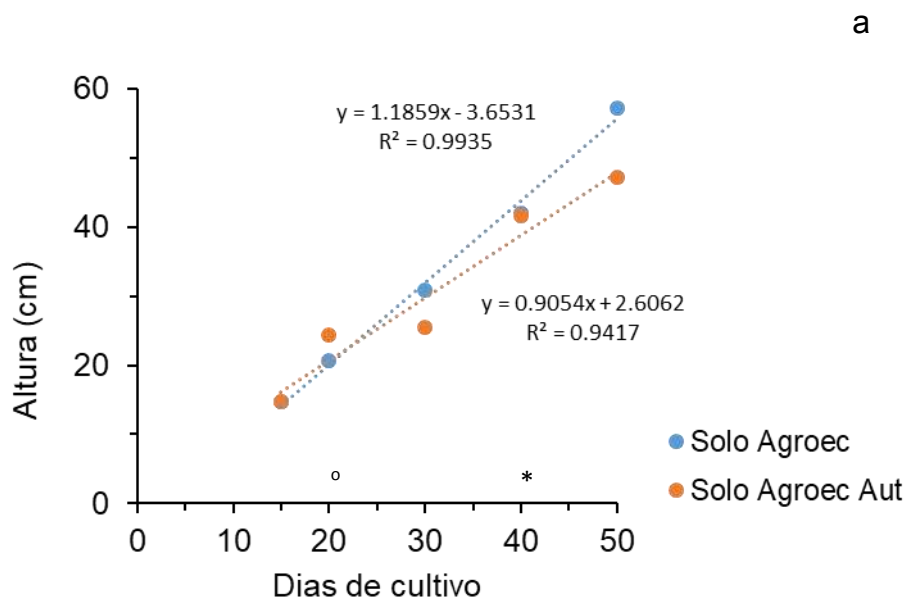


Figura 8: Altura das plantas de milho aos 10, 20, 30, 40 e 50 d de cultivo em casa de vegetação.

Tabela 7: Massa fresca e seca, teor e conteúdo de P das plantas de milho cultivados por 50d em casa de vegetação.

	Massa fresca ----- g/vaso	Massa seca -----	Teor de P dag/kg	Conteúdo de P mg
Experimento 1				
S _{or}	36,7 a	4,7 a	0,20 a	9,5 a
S _{orA}	22,6 b	3,0 b	0,07 b	2,3 b
p-Valor	0,0009	0,0038	0,0000	0,0001
CV (%)	14,7	17,3	12,4	25,9
Experimento 2				
B _{se}	9,5 a	1,6 a	0,07 b	1,1
B _{seA}	1,5 b	0,3 b	0,24 a	0,7
B _A	0,8 b	0,3 b	0,26 a	0,7
p-Valor	0,0000	0,0000	0,0002	ns
CV (%)	33,1	39,2	28,8	49,3

Médias na mesma coluna dentro de cada experimento e seguidas por mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,10$).

A produção de biomassa no solo cultivado sob manejo agroecológico (colocar as siglas corretas) e no horizonte B foram menores em solos sem a presença de microrganismos (solos autoclavado, Tabela 7). O efeito da eliminação dos microrganismos pelo tratamento térmico, embora não tenha afetado as características químicas e físicas do solo e nem tenha sido detectada pelas avaliações microbiológicas, prejudicou o desenvolvimento das plantas de milho.

Ressalta-se a importância da manutenção da comunidade microbiana no solo, o que é conseguido com práticas de manejo mais sustentáveis que garantam substratos diversos para as atividades desses microrganismos e que

restringam o uso de biocidas que comprometem a biodiversidade do solo. Microrganismos considerados benéficos ou associativos são comumente encontrados na rizosfera, região de elevada atividade microbiana em resposta à presença expressiva de exsudatos radiculares (DANTAS et al., 2009). Nessa região ocorre a interação solo-planta, com grande potencial de impacto sobre o crescimento vegetal. Diferentes processos são de ocorrência comum na rizosfera entre os microrganismos e as plantas, tais como a fixação biológica de N, produção de fitormônios e associações micorrízicas, que contribuem para com a transferência de moléculas sintetizadas pelos microrganismos para a planta ou pelo incremento na absorção ou aumento da disponibilidade de certos nutrientes (OLIVEIRA et al., 2003).

A remoção de microrganismos pela autoclavagem no solo sob manejo agroecológico (S_{or} x S_{orA}) reduziu o conteúdo de P nas plantas (Tabela 7) e contribuiu para a má nutrição das plantas, como observado pelos sintomas de deficiência de P (folhas avermelhadas, Figura 7). No experimento 2 não se verificaram diferenças entre os teores de conteúdo de P nas plantas avaliadas em resposta aos tratamentos aplicados.

Sistemas agroecológicos, com maior adição de matéria orgânica, têm sido associados com ambientes com maior disponibilidade de P (MOURA et al., 2017). Estes autores apontaram o papel da adição de matéria orgânica como fundamental para o incremento dos teores de P ao longo dos anos nessas áreas. Silva (2017) verificou maiores teores totais e residuais P em cafezais manejados sob sistemas agroecológicos, o que foi atribuída a preservação da matéria orgânica em relação aos demais manejos. O solo agroecológico conseguiu nutrir melhor as plantas de milho na presença da microbiota (S_{or}) do que na sua ausência promovida pela autoclavagem (S_{orA}). O teor de P alcançado nas plantas aos 50 d de cultivo foi próximo ao valor considerado como adequado para plantas que recebem doses de fertilizantes, cuja concentração no teor foliar deve estar entre 0,25 a 0,35 dag/kg para folhas coletadas com 60 d após plantio (MARTINEZ et al., 1999). A análise do teor de P nas plantas do experimento 2 ficou prejudicada devido a baixa produção de biomassa, o que eleva artificialmente a concentração de nutrientes nas folhas.

O conteúdo de P (Tabela 7) nas plantas de milho cultivado em solo proveniente de manejo agroecológico demonstra a importância da comunidade

microbiana na nutrição vegetal. De acordo com dados obtidos através da contagem de esporos (Tabela 5), este é mais abundante no referido tratamento o que leva a suposição que houve maior colonização micorrízica, favorecendo assim maior disponibilidade de P e com isso a maior absorção pelas plantas. O conteúdo deste nutriente nas plantas foi mais de quatro vezes o conteúdo de P quando os microrganismos foram eliminados pela autoclavagem (S_{orA}).

Os microrganismos estão associados a diversos mecanismos de disponibilização de P no solo para a absorção pelas plantas. A produção de ácidos orgânicos pelos microrganismos, tais como ácido láctico, glicólico, cítrico e málico, podem atuar dissolvendo diretamente materiais fosfáticos liberando P na solução do solo (RICHARDSON, 2001) que são processados por microrganismos produtores de fosfatases e fitases (NAHAS, 2002), ficando disponíveis para a absorção. Além dos microrganismos solubilizadores de P, os FMAs são importantes na disponibilização deste nutriente (CARDOSO et al., 2003). Eles atuam como uma extensão das raízes, aumentando o volume de solo explorado e, portanto, a área de absorção de P, além de estarem associados à possibilidade de absorção de algumas formas de P não disponíveis para as plantas (CARDOSO et al., 2004; FOLLI-PEREIRA et al., 2012).

O conteúdo de P nas plantas de milho cultivado no experimento 2 não diferiu entre os tratamentos (Tabela 7) isto possivelmente devido ao alto coeficiente de variação verificado, pois houve um acréscimo de aproximadamente 60% do conteúdo de P do horizonte B não autoclavado em relação ao horizonte B autoclavado. Uma vez que a presença de FMA favorece a disponibilização de P para as plantas, este resultado corrobora o que foi verificado na contagem de esporos (Tabela 5), onde não houve diferença para o número de esporos para B_{se} e B_{seA} .

Enquanto as análises microbiológicas não indicaram efeito dos tratamentos sobre a comunidade microbiana, a planta revelou tal indicação, demonstrando ser um indicador mais sensível. Portanto, deve-se priorizar o uso das plantas como indicadoras da qualidade do solo, procedimento que adicionalmente tem as vantagens de ser mais simples e barato.

Problemas operacionais dificultaram a melhor discriminação microbiológica entre os tratamentos, o que em parte, pode ser atribuída à opção

de se obter DNA suficiente para a execução do DGGE e cálculo dos índices de dominância, diversidade e riqueza de espécies.

5. CONCLUSÕES

A atividade microbiológica - como presente no manejo agroecológico, é essencial no manejo dos solos, entretanto se for restrita, ocasiona perdas de produtividade em plantas.

O uso de matéria orgânica em solos de baixa fertilidade por si só não garante o desenvolvimento das plantas, devendo ser associada à atividade biológica.

O uso de coquetéis de microrganismos apresenta o potencial de favorecer o desenvolvimento de plantas, mesmo em solos de baixa fertilidade.

6. REFERÊNCIAS

- ALTIERI, M. A. **Agroecologia: bases científicas para uma agricultura sustentável**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 2012.
- ANGELINI, G.A.R.; LOSS, A.; PEREIRA, M.G.; TORRES, J.L.R.; JÚNIOR, O.J.S. Colonização micorrízica, densidade de esporos e diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em solo de Cerrado sob plantio direto e convencional. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, p.115-130, 2012.
- ARAÚJO, A.P.; MACHADO, C.T.T. Fósforo. In: FERNANDES, M.S., A. M. (Org.) **Nutrição mineral de plantas**. v. 1. Viçosa: SBCS, 2006. p. 253-280.
- ARRUDA, M. R.; MOREIRA, A.; PEREIRA, J.C.R. **Amostragem e cuidados na coleta de solo para fins de fertilidade**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 18 p. 2014.
- ATLAS, R.M.; BARTHA R. **Microbial Ecology: Fundamentals and Applications**: Benjamin Cummings, 533 p. 1997.
- BASTOS, A.L.; COSTA, J.P.V.; SILVA, I.F.; RAPOSO, R.W.C.; OLIVEIRA, F.A.; ALBUQUERQUE, A.W. Resposta do milho a doses de fósforo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, p.485-491, 2010.
- BONFIM, F.P.G.; HONÓRIO, I.C.G.; REIS I.L.; PEREIRA, A.J.; SOUZA, D.B. **Caderno dos microrganismos eficientes (EM)**: instruções práticas sobre uso ecológico e social do EM. Universidade Federal de Viçosa: Departamento de Fitotecnia; 2011.
- BONFIM, J. A. MATSUMOTO, S.N. LIMA, J.M. CÉSAR, F.R.C.F. SANTOS, M.A.F. Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e aspectos fisiológicos em cafeeiros cultivados em sistema agroflorestal e a pleno sol. **Bragantia**, v.69, p.201-206, 2010.
- BORGES, A.C.M.R.; KATO, O. R.; PINHEIRO, H. A.; SHIMIZU, M. K.; RANGEL-VASCONCELOS, L.G.T.; OLIVEIRA JÚNIOR, M. C. M.de. Crescimento e produção de fitomassa de variedades de milho em diferentes manejos da capoeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.46, p.143-151. 2011.
- BRASIL. Instrução normativa nº 46, de 06 de outubro de 2011. *Lei nº 10831, de 23 de dezembro de 2003*. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 06 outubro. 2011.

- BROWER, J.E.; ZARR, J.H. **Field and laboratory methods for general ecology**. W.C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa, USA. 226 p. 1984
- CAMPANHA, M. M.; SANTOS, R. H. S. Análise comparativa das características da serrapilheira e do solo em cafezais (*Coffea arabica* L.) cultivados em sistema agroflorestal e em monocultura na zona da mata-MG. **Revista Árvore**, v.31, p.805-812, 2007
- CARA, C. A. Modernização da agricultura brasileira e impactos ambientais. **Perspectivas geográficas**. N° 5 Vol. 1 e 2. p.126-135, 2009.
- CARDOSO I.M.; FERRARI, E.A. Construindo o conhecimento agroecológico: trajetória de interação entre ONG, universidade e organizações de agricultores. **Revista Agriculturas**. v.3., p.28-32, 2006.
- CARDOSO, E. J. B. N.; CARDOSO, I. M.; NOGUEIRA, M. A.; BARETA, C. R. D. M.; PAULA, A. M. de. Micorrizas arbusculares na aquisição de nutrientes pelas plantas. In: SIQUEIRA, J. O.; SOUZA, F. A. de.; CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S.M. (Ed) **Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil**. Lavras: UFLA, 716 p. 2010.
- CARDOSO, I. M.; BODDINGTON, C. JANSSEN, B. H.; OENEMA, O; KUYPER, T. Distribution of mycorrhizal fungal spores in soils under agroforestry and monocultural coffee systems in Brazil. **Agroforestry Systems**, v.58, p.33-43, 2003.
- CARDOSO, I. M.; FERRARI, E. A. Construindo o conhecimento agroecológico: trajetória de interação entre ONG, universidade e organizações de agricultores. **Revista Agriculturas**, v.3, p.28-32, 2006.
- CARDOSO, I.M. GUIJT, I. FRANCO, F.S. CARVALHO, A.F. e FERREIRA NETO, P.S. Continual Learning for Agroforestry System Design: University, NGO and farmer partnership in Minas Gerais, Brazil. **Agricultural. Systems**, v.69, p.235-257, 2001a.
- CARDOSO, I.M.; GUIJT, I.; FRANCO, F.S.; CARVALHO, A.F.; FERREIRA NETO, P.S. (2001) Continual learning for agroforestry system design: university, NGO and farmer partnership in Minas Gerais, Brazil. **Agricultural Systems**. v.69, p.235-257, 2001b.
- CARIDE, C.; PIÑEIRO, G.; PARUELO, J.M. How does agricultural management modify ecosystem services in the argentine Pampas? The effects on soil C

- dynamics. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.154, p.23-33, 2012.
- CARINI, P.; MARSDEN, P.J.; LEFF, J.W.; MORGAN, E.E.; STRICKLAND, M.S.; FIERER, N. Relic DNA is abundance in soil and obscures estimates of soil microbial diversity. **Nature microbiology**, v.2, 2016.
- CORDELL, D.; DRANGERT, J-O.; WHITE, S. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. **Global Environmental Change**. Guilford, v.19, p.292-305, 2009.
- CORNEJO, P.; AZCON-AGUILAR, C.; BAREA, J. M.; FERROL, N. Temporal Temperature Gradient Gel Eletrophoresis (TTGE) as a tool for the characterization of arbuscular mycorrhizal fungi. **FEMS Microbiology Letters** v.241., p.265-270, 2004.
- COSTA, P.M.O. **Dinâmica de Serapilheira e diversidade de fungos em solo de sistema agroflorestal**. Recife. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco. 94p. 2015.
- CUNHA, J.F.; FRANCISCO, E.A.B.; PROCHNOW, L.I. Balanço de Nutrientes na Agricultura Brasileira no período de 2013 a 2016. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n.162, p.3-14, 2018.
- DANTAS, J. S. SOUZA, A.P. FARIAS, M.F. NOGUEIRA, V.F.B. Interações entre grupos de microrganismos com a rizosfera - **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v.2, p.213-224, 2009.
- DENG, W.; WANAPAT, M.; MA, S.; CHEN, J.; XI, D.; HE, T.; MAO, H. Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences manifest rumen bacterial diversity in Gayals (*Bosfrontalis*) fed fresh bamboo leaves and twigs (*Sinarumdinaria*). **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**. v.20, p.1057, 2007.
- DIAS, S.C. Planejando estudos de diversidade e riqueza: uma abordagem para estudantes de graduação. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. v.4, p.373-379, 2004.
- DUARTE, E. M. G.; CARDOSO, I. M.; FÁVERO, C. Terra Forte. **Agriculturas**, v.5, p.11-15, 2008.
- DUARTE, E.M.G.; CARDOSO, I.M; SOUZA, H. N. Sistemas agroflorestais, o manejo do solo e a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica. **Cadernos de Agroecologia**. v.2, p.102-115, 2007.

- EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. TEIXEIRA, P. C.; DONAGEMMA, G. K.; FONTANA, A.; TEIXEIRA, W. G.: editores técnicos. – 3. ed. rev. e ampl. – Brasília, DF :Embrapa, 2017.
- EMBRAPA. **Portfólio de tecnologias da Embrapa**. 2. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1996. Não paginado.
- EMBRAPA. Embrapa Milho e Sorgo. **BRS 4157: Sol-da-manhã NF**. Serviço de Produção de Sementes Básicas.1990. 2p. Disponível em: https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/487305/1/Sol_damanha.pdf.
- FEIDEN, A. Agroecologia: introdução e conceitos. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. (Org.). **Agroecologia: princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável**. v. 1. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.49-70, 2005.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, p.1039-1042, 2011.
- FOLLI-PEREIRA, M.S.; MEIRA-HADDAD, L.; BAZZOLLI, D.M.S.; KASUYA, M.C.M. Micorriza arbuscular e a tolerância das plantas ao estresse. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.36, p.1663-1679, 2012.
- GERDEMAN, J. W.; NICHOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal endogene extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 46, p235-244, 1963.
- GLIESSMAN, S.R. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável**. Porto Alegre: Editora da Universidade – UFRGS, 2000.
- GRANT, C.A.; PLATEN, D.N.; TOMAZIEWICZ, D.J.; SHEPPARD, S.C. A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. **Informações Agrônomicas**, Piracicaba, n.95, 2001.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST - Palaeontological statistics, ver. 1.89. Paleontological Museum, University of Oslo, Noruega. (<https://folk.uio.no/ohammer/past/>). 2008.
- HELGASON, T.; DANIELL, T.J.; HUSBAND, R.; FITTER, A.H.; YOUNG, J.P.W. Ploughing up the wood-wide web? **Nature**, v.394, p.431, 1998.
- HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K. & WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes

- encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, p.3233-3241, 1997.
- HIGA, T. What is EM technology? **EM World Journal**. v.1, p.1-6, 2000.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censos Populacionais Agropecuários. 2010. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em 12 de Dezembro de 2018.
- JOSE, S. Agroforestry for ecosystem services and environmental benefits: an overview. **Agroforestry Systems**, v.76, p.1-10, 2009.
- KARAMI, A.; HOMAEE, M.; AFZALINIA, S.; RUHIPOUR, H.; BASIRAT, S. Organic resource management: Impacts on soil aggregate stability and other soil physico-chemical properties. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. v.148, p.22-28, 2012.
- KER, J. C. **Mineralogia, sorção e dessorção de fosfato, magnetização e elementos-traços de Latossolos do Brasil**. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG. 181p. 1995.
- KLEIN, C.; AGNE, S. A. A. Fósforo: de nutriente à poluente! **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v.8, p.1713-1721, 2012.
- KÖPPEN W. **Climatologia: com um estúdio de los climas de la tierra**. New Gersey: Laboratory of Climatology; 1948.
- LEE J.; LEE, S.; YOUNG, J.P.W. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. **FEMS Microbiology Ecology**., v.65, p.339–349, 2008.
- LOSS, A.; ROBLES, G.; CALLEGARIO, A.; LÃ, O.; LIMA, M.; RIBEIRO, E.Y.; SAGGIN, O. Atributos químicos do solo e ocorrência de fungos micorrízicos sob áreas de pastagem e sistema agroflorestal, Brasil. **Acta Agronômica**. v.58, p.91-95, 2009.
- MAGURRAN, A.E. **Ecological Diversity and its measurement**. Princeton, New Jersey, 79 p. 1988.
- MAIA, C.M.B.F.; DEDECEK, R.A.; MALUCELLI, C.S. **Identificação de repelência à água em solos sob plantios florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2005. 6 p. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 147).

- MARIN, A. M. P. **Impactos de um sistema agroflorestal com café na qualidade do solo**. Viçosa (Tese) Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas. Universidade Federal de Viçosa. 2002.
- MARTINEZ, H.E.P.; CARVALHO, J.G.; SOUZA, R.B. **Diagnose foliar**. In: RIBEIRO, A.C.; GUIMARÃES, P.T.G.; ALVAREZ V., V.H. (Eds). **Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais. 5ª. Aproximação**. Viçosa: Comissão de Fertilidade do Estado de Minas Gerais-CFSEMG. p.143-168. 1999.
- MASSAD, M.D.; OLIVEIRA, F. L.; DUTRA, T. R.; FÁVERO, C. Produtividade do milho em sistema agroecológico na caatinga mineira. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v.9, p.218-229, 2014.
- MAZARRO, S.M.; GUIMARÃES, S.S.; SZEPAHUK, V.; RODRIGUES, M.B.; PALADINI, M.V. Avaliação do tempo de autoclavagem sobre o potencial de contaminação de substrato na técnica de produção em serragem de cogumelos *Ganoderma lucidum*. **Synergismus scyentifica**. n.2, p.1-4, 2007.
- MENDES FILHO, P.F, Vasconcellos, R.L.F. Evaluating the Potential of Forest Species Under “Microbial Management” for the Restoration of Degraded Mining Areas. **Water, Air, e Soil Pollution**, v.208, p.79-89, 2010.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 729 p. 2006
- MOURA, I.N. B. M.; SOUZA, C.M.M; SILVA, A.C.R.; LIMA, R.N.S.; RÊGO, L.G.S.; AMBRÓSIO, M.M.Q. Disponibilidade de fósforo em solos sob produção agroecológica em Governador Dix-Sept Rosado, Rio Grande do Norte. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v.12, p.862-865. 2017.
- MYERS, R.M.; FISCHER, S.G.; LERMAN, L.S.; MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, v.13, p.3131-3145, 1985.
- NAHAS, E. Microrganismos de solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. 2002. **Bragantia**, v.61, p.267-275, 2002.
- NASCIMENTO, J.T.; SILVA, I.F.; SANTIAGO, R. D.; NETO, L.F.S. Efeito de leguminosas nos atributos físicos e carbono orgânico de um Luvisolo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.825-831, 2005.

- NOVAIS, R.F.; SMITH, T.J. Fósforo em solo e planta em condições tropicais. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 399 p. 1999.
- ODUM, E.P. **Populações em comunidades**. In: Odum, E.P. (Eds). Ecologia. Guanabara, São Paulo. p.258-272. 1988.
- OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J.I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Embrapa Agrobiologia, Itaguaí, RJ. 40p. 2003.
- PANTANO, G. GROSSELI, G.M. MOZETO, A.A. FADINI, P. S. Sustentabilidade no uso do fósforo: Uma questão de segurança hídrica e alimentar. **Química Nova** [online]. v.39, p.732-740, 2016.
- PETERSEN, P. F.; WEID, J. M. von der.; FERNANDES, G. B. Agroecologia: reconciliando agricultura e natureza. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.30, n.252, 2009.
- PIROLI, E. L.; PIROLI, V. L. B. Sistemas agroflorestais em assentamentos rurais: Aplicação no município de Rosana, SP, Brasil. **Revista Ciência em Extensão** v.14, p.159-169, 2018.
- PRATES JÚNIOR, P.; CUSTÓDIO, A.M.; GOMES, T. O. Agroecologia: fundamentos teóricos e epistemológicos. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v.11, n. 3, 2016
- PRATES JÚNIOR, P.; MOREIRA, B.C.; da SILVA, M.C.S.; VELOSO, T.G.R.; STÜRMER, S.L.; FERNANDES, R.B.A. MENDONÇA, E.S.; KASUYA, M.C.M. Agroecological coffee management increases arbuscular mycorrhizal fungi diversity. **PLoS ONE**. v.14.p.e0209093,2019.
- RICHARDSON, A.E. Prospects for using soli microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v.28, p.897-906, 2001.
- SANTOS, C.F.; SIQUEIRA, E.S.; ARAÚJO, I.T.; MAIA, Z.M.G. A agroecologia como perspectiva de sustentabilidade na agricultura familiar. **Ambiente & Sociedade**, v.17, p.33-52, 2014.
- SANTOS, L.F. **Micro-organismos eficientes: diversidade microbiana e efeito na germinação, crescimento e composição química de capim-marandu**. Viçosa. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) - Universidade Federal de Viçosa. 2016.

- SHIN, K.; VAN DIEPEN, G.; BLOK, W.; VAN BRUGGEN, A.H.C. Variability of Effective Micro-organisms (EM) in bokashi and soil and effects on soil-borne plant pathogens. **Crop Protection**, v.99, p.168-176, 2017.
- SILVA, N. M. R. M. **Diversidade microbiana e microbiota solubilizadora de fosfato em solos de cafezais orgânicos em sistemas agroflorestais e a pleno sol**. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2017.
- SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GLANDORF, B.; VAN ELSAS, J.D.; WERNARS, K. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. **Applied Environmental Microbiology**. v.65, p.2614-2621, 1999.
- SMITH, F.A.; SMITH, S. E. What is the significance of the arbuscular mycorrhizal colonisation of many economically important crop plants? **Plant Soil**, v.348, p.63-79, 2011.
- SMITH, S.E.; READ, D.J. 2008. **Mycorrhizal symbiosis**, 3rd edn. London, UK: Academic Press.
- SOUMARE, M.D.; MNKENI, P.N.S.; KHOUMA, M. Effects of *Casuarina equisetifolia* Composted Litter and Ramial-Wood Chips on Tomato Growth and Soil Properties in Niayes, Senegal. **Biological Agriculture & Horticulture**, v.20, p.111-123, 2002.
- SOUSA, C.S. MENEZES, R.S.C. SAMPAIO, E.V.S.B. LIMA, F.S.L. Glomalina: Características, produção, limitações e contribuição nos solos. Semina: **Ciência Agrônômica**, v.33, p.3033-3044, 2012.
- SOUSA, D.M.G.; LOBATO, E. REIN, T.A. Adubação com fósforo. In: SOUSA, D.M.G. & LOBATO, E., eds. **Cerrado: Correção do solo e adubação**. 2.ed. Planaltina, Embrapa Cerrados, 2004. p.147-168.
- SOUZA, F. A.; GOMES. E. A.; VASCONCELOS, M. J. V.; SOUSA, S. M. **Micorrizas arbusculares: perspectivas para aumento da eficiência de aquisição de fósforo (P) em Poaceae – gramíneas**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 30 p., 2011.
- SOUZA, H.N.; CARDOSO, I.M.; FERNANDES, J.M.; GARCIA, F.C.P.; BONFIM, V.R.; SANTOS, A.C.; CARVALHO, A.F.; MENDONÇA, E.S. Selection of

- native trees for intercropping with coffee in the Atlantic Rainforest biome. **Agroforestry Systems**, v.80, p.1-16, 2010.
- TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. Análise de solo, plantas e outros materiais. 2. ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Solos. **Boletim Técnico** 118 p. 1995.
- TORTORA, G.J., FUNKE B.R, CASE, C.L. Microbiologia, 8ed, Artmed, Porto Alegre, 2005.
- TRABULSI, L.R, ALTERTHUM, F. Microbiologia, 4ed, Editora Atheneu, São Paulo, 2005.
- VAINIO, E.J.; HANTULA, J. Variation of RAMS markers within the intersterility groups of *Heterobasidion annosum* in Europe. **European Journal of Forest Pathology**, v.29, p.231–246, 1999.
- VIEIRA JÚNIOR J.O.L. **Comunidades de nematoides do solo em cafeeiros agroflorestais com diferentes sistemas de adubação orgânica**. Viçosa. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) – Universidade Federal de Viçosa. 2016.
- WEZEL A, BELLON S, DORÉ T, FRANCIS C, VALLOD D, DAVID C. Agroecology as a science, a movement, and a practice. **Agronomy for Sustainable Development**. v.29, p.503-515, 2009.
- WHITE, T.J.; BRUNS, S.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR Protoc: A Guid Methods Appl**. v.38, p.315-322, 1990.